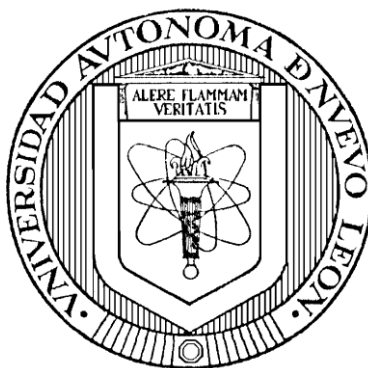


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR INDUCIDO POR EL  
IMMUNEPOTENT CRP EN COMBINACIÓN CON CICLOFOSFAMIDA EN  
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

Por

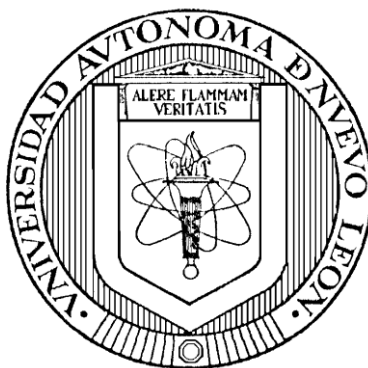
ANA LUISA RIVERA LAZARIN

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN  
EN INMUNOBIOLOGÍA

Julio, 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR INDUCIDO POR EL  
IMMUNEPOTENT CRP EN COMBINACIÓN CON CICLOFOSFAMIDA EN  
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

Por

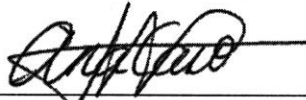
ANA LUISA RIVERA LAZARIN

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN  
EN INMUNOBIOLOGÍA

Julio, 2020

ESTUDIO DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR INDUCIDO POR EL  
IMMUNEPOTENT CRP EN COMBINACIÓN CON CICLOFOSFAMIDA EN  
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

Comité de Tesis



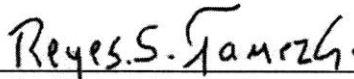
---

Dra. Ana Carolina Martínez Torres  
Director de Tesis



---

Dra. Cristina Rodríguez Padilla  
Secretario



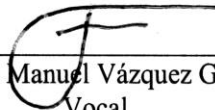
---

Dr. Reyes S. Tamez Guerra  
Vocal



---

Dr. Moisés Armides Franco Molina  
Vocal

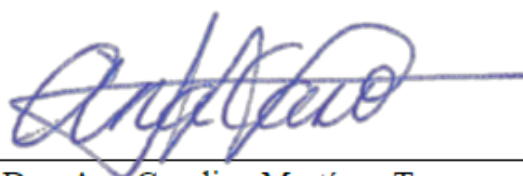


---

Dr. José Manuel Vázquez Guillén  
Vocal

ESTUDIO DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR INDUCIDO POR EL  
IMMUNEPOTENT CRP EN COMBINACIÓN CON CICLOFOSFAMIDA EN  
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

**Dirección de Tesis**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ana Carolina Martínez Torres', is positioned above a horizontal line.

---

Dra. Ana Carolina Martínez Torres  
Director de Tesis



*Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Laboratorio de Inmunología y Virología por brindarme el apoyo económico y la infraestructura para realizar este proyecto.*

## AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios, por ser un Padre infinitamente misericordioso y amoroso, sin ti nada sería posible, gracias por ser mi luz, mi guía y mi sostén. Por obrar aún en mis decisiones no tan acertadas, por esperarme siempre con paciencia, por no cansarte en buscarme y por demostrarme una y mil veces que para ti nada es imposible.

A la Dra. Ana Carolina, mi completa gratitud, respeto y admiración por usted. Estoy infinitamente agradecida de que haya creído en mí sin ningún precedente, por aceptarme en su laboratorio, por forjar en mí un carácter más fuerte y una actitud más abierta. Son tantas sus enseñanzas tanto profesionales, como personales que no tendría palabras para describirlas. Gracias por saber el momento preciso para acercarse y aconsejarme cuando yo no veía más allá de mi propio pensamiento. Gracias por compartirse tal como es, con toda su sabiduría. Y principalmente, gracias por su paciencia y por no rendirse.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por siempre invitarnos a estar en una mejora continua, porque con su ejemplo nos invita a buscar más allá de nuestros límites y por brindarnos las herramientas necesarias para continuar con las investigaciones.

A los miembros de mi comité, Dr. Reyes Tamez, por motivarnos a trabajar duro y su guía.

Al Dr. Moisés Franco, por sus pláticas, su guía y por invitarme a cuestionarme hasta lo que creo conocer. Gracias por su apoyo y el de su laboratorio.

Dr. José Manuel, gracias por las pláticas y el café mientras yo me sentía perdida, frustrada o estresada. Gracias por tu honestidad y transparencia. Gracias por tu simplicidad y por hacerme poner los pies en la tierra. Infinitas gracias.

Gracias a mis compañeros de maestría, Pedro, Paola, Juan, Ale y Enrique. La maestría no hubiera sido lo mismo sin ustedes. Gracias por nunca dejarme sola, por colaborar conmigo y por todo lo que me enseñaron. Llegar aquí no fue fácil, pero sepan que cada uno contribuyó de una manera que no imaginan a que pudiera lidiar con las dificultades que enfrenté. Gracias por las eternas risas y por permanecer en los momentos de estrés.

A los guapos del L-14, por ser tan pacientes conmigo. Gracias infinitas porque todos compartieron conmigo sus enseñanzas, su trabajo tan comprometido, y entregado me inspiró a seguir trabajando. Gracias a cada uno de ustedes, Ashanti, Alan, Michel, Andrea, Jorge, Lili, Rodo, y a Luis, Andrea y Karla, todos contribuyeron en mi formación. María, gracias por confiar en mí y por compartir tus sentimientos conmigo.

Gracias Helen, desde que llegué siempre estuviste ahí para enseñarme todo, aunque esto significara sacrificios para ti. Gracias por escucharme y guiarme siempre que lo necesité con infinita paciencia e interminable entereza.

Gracias Ale, no pude tener mejor amiga de lab y de maestría. Gracias por todo lo que me enseñaste, por tus preguntas, por tu paciencia, por tu guía, por tus palabras. Gracias por escucharme hasta el cansancio, por entenderme y por buscar el bien común. Gracias por ser como eres.

Gracias Kenny, por ser tan centrado y a la vez tan soñador, por inspirarme a seguir aprendiendo y por ser guía desde que llegué al lab.

Gracias Paty, por tu gran empatía, por tu compromiso, por tu escucha, tu paciencia y por ser una persona con una capacidad de compartir impresionante. Te admiro mucho. Gracias por formar parte del equipo quimios.

A mi maestro y amigo Rafa, gracias por todo lo que me enseñaste. Trabajar contigo fue una de las cosas que me ayudó a soportar muchas dificultades. Gracias por tus consejos, gracias por ser tan sabio, gracias por confiar en mí incluso cuando yo no lo hacía. Gracias por escucharme interminablemente y por tener las palabras precisas para animarme y motivarme. Gracias por ser un gran equipo, por buscar la sinergia no solo en tema de tesis, sino también en nuestras investigaciones. Por ver por mí también, creo que no terminaría de agradecerte. Gracias por ser y por estar. A ti y a Meli, por apoyarme aún sin conocerme.

A mis amigos, Karlita, Lore, Job, Jesús, Paloma, Kari, Lety, Edith, Enrique, Dany, Rodrigo y a mi cuñado Víctor, por siempre tener palabras de motivación y por creer en mí. Gracias por todo.

A mis roomies, Isis, Brisia y Yolanda, por ser mi segunda familia, por cuidarme y preocuparse por mí, por los momentos de diversión y las tardes difíciles.

Finalmente, a mi mayor apoyo. Gracias a mi familia. Podré tener muchas cosas, pero la más valiosa, son ustedes. Sin ustedes no podría lograr nada. A mi mami, por permanecer. A mi papá, Carlos Rivera, por ser la persona que más me apoya, aun en las ideas más locas. Por empujarme a vencer mis miedos, por creer en mí, por no cansarte en sostenerme, por tus palabras de aliento y tus regaños oportunos, por tu guía y por tu infinito amor.

Gracias a mis hermanas, Perla y Fátima, por ser quienes son, por su paciencia, su amor, sus cuidados, sus consejos, su escucha, por creer en mí, por estar ahí, por no dejarme caer nunca, por soportar mi estrés, cansancio, enojos, mis ausencias, por compartir conmigo la emoción, el miedo, el logro...

Los amo infinitamente, todo esto es gracias a ustedes.

*A ti mami, Patricia Lazarín, por siempre te llevo conmigo. Tú eres mi completa  
inspiración y pienso en ti siempre.*

*A Carlos Rivera, mi completo respeto y admiración por ti.  
A Perla Rivera y Alhelí Rivera, nunca tendré mayor bendición que tenerlas en mi vida.  
Los amo con toda mi fuerza.*



“La humanidad también necesita soñadores, para quienes el desarrollo de una tarea sea tan cautivante que les resulte imposible dedicar su atención a su propio beneficio”.

Marie Curie.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cáncer.....	3
2.2 Cáncer de mama .....	4
2.3 Tratamientos para cáncer de mama .....	9
2.4 Quimioterapia.....	11
2.5 Muerte celular regulada (RCD).....	15
2.5 Ciclofosfamida (CYP).....	19
2.6 Terapia múltiple.....	22
2.7 IMMUNEPOTENT CRP (ICRP).....	24
3. JUSTIFICACIÓN .....	26
4. HIPÓTESIS.....	27
5. OBJETIVOS .....	28
5.1 Objetivo general .....	28
5.2 Objetivos específicos.....	28
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
6.1 Cultivos celulares .....	29
6.2 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) .....	29
6.3 Elaboración del IMMUNEPOTENT CRP .....	30
6.4 Ciclofosfamida .....	30
6.5 Evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT .....	31
6.6 Análisis por citometría de flujo .....	32
6.7 Análisis de la liberación de ATP.....	37
6.8 Evaluación de la morfología celular.....	37
6.9 Análisis estadístico .....	38
7. RESULTADOS.....	39
7.1 El ICRP y la CYP reducen la viabilidad e inducen muerte celular de las líneas MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 .....	39
7.2 La combinación del ICRP con CYP induce muerte celular potenciada en MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 .....	41

7.3 La combinación del ICRP con CYP no induce muerte celular potenciada de las PBMC en las concentraciones que presentan efecto antitumoral.....	46
7.4 El ICRP en combinación con CYP induce alteraciones mitocondriales en MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 .....	47
7.5 La combinación del ICRP con CYP induce estrés oxidativo en MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1.....	49
7.6 El tratamiento del ICRP en combinación con CYP induce activación de caspasas en células MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1.....	51
7.7 El tratamiento con la combinación de ICRP con CYP induce muerte celular independiente de caspasas y dependiente de ROS .....	53
7.8 El tratamiento con la combinación del ICRP con CYP induce la degradación del ADN a las 12 y 24 horas en MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1. ....	56
7.9 El tratamiento con la combinación del ICRP con CYP induce cambios morfológicos en células de cáncer de mama .....	57
7.10 La combinación del ICRP con CYP induce exposición/ liberación de DAMPs ..	58
8. DISCUSIÓN .....	62
8.1 Potencial citotóxico del ICRP, CYP y la combinación ICRP+CYP .....	63
8.2 Alteraciones mitocondriales inducidas en el proceso de muerte.....	69
8.3 Mediadores bioquímicos de la muerte celular.....	72
8.4 Efectores de la muerte celular inducida por los tratamientos.....	73
8.5 Alteraciones nucleares y morfológicas.....	75
8.6 Capacidad molecular de muerte celular inmunogénica.....	78
9. CONCLUSIONES .....	81
10. PERSPECTIVAS .....	82
11. BIBLIOGRAFÍA.....	83
12. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO.....	93

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Modalidades de muerte celular regulada.....	17
Tabla 2. Concentraciones citotóxicas de ICRP y CYP en MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1.....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sellos distintivos del cáncer.....	3
Figura 2. Número de casos nuevos y de mortalidad por cáncer en ambos sexos y todas las edades a nivel mundial.....	4
Figura 3. Clasificación convencional de los estadios de cáncer de mama.....	5
Figura 4. Tratamientos para cáncer de mama de acuerdo a los receptores.....	14
Figura 5. Principales modalidades de muerte celular regulada.....	16
Figura 6. Fórmula para determinar el porcentaje de viabilidad celular relativa.....	31
Figura 7. El tratamiento con ICRP y CYP reduce la viabilidad e induce muerte celular.....	40
Figura 8. El ICRP en combinación con CYP induce muerte celular potenciada.....	43
Figura 9. El tratamiento con ICRP en combinación con CYP afecta el ciclo celular.....	45
Figura 10. La combinación del ICRP con CYP no potencia la muerte celular de PBMC....	47
Figura 11. El ICRP en combinación con CYP induce pérdida de potencial de membrana mitocondrial.....	49
Figura 12. El ICRP en combinación con CYP induce estrés oxidativo.....	51
Figura 13. El ICRP en combinación con CYP induce la activación de caspasas.....	53
Figura 14. La muerte celular inducida por el tratamiento con ICRP y CYP es independiente de caspasas.....	54
Figura 15. La muerte celular inducida por el tratamiento con ICRP y CYP es dependiente de ROS.....	55
Figura 16. El tratamiento con ICRP en combinación con CYP induce degradación del ADN a las 12 y 24 h.....	57
Figura 17. El tratamiento con ICRP en combinación con CYP induce cambios morfológicos.....	58
Figura 18. El ICRP en combinación con CYP induce la exposición de calreticulina.....	60
Figura 19. El ICRP en combinación con CYP induce la liberación de ATP.....	61

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

5-fluorouracilo	5-FU
6-mercaptopurina	6-MP
Actina de músculo liso	SMA
Aloficocianina	APC
American Type Culture Collection	ATCC
Anexina V	AnnV
Anticuerpo anti-calreticulina acoplado a ficoeritrina	CRT-PE
Biopsia de ganglios linfáticos centinela	SLNB
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio	MTT
Buffer de fosfatos salinos	PBS
Buffer de unión de anexina	ABB
Calreticulina	CRT
Cáncer de mama triple negativo	TNBC
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	DCIS
Carcinoma lobular <i>in situ</i>	LCIS
Catalasa	CAT
Células dendríticas	DC
Células madre de cáncer mamario	MCSCs
Células mononucleares de sangre periférica	PBMC
Ciclofosfamida	CYP
Cirugía conservadora de mama	BCS
Citoqueratina	CK
Clasificación de células marcadas por fluorescencia	FACS
Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub>
Cloruro de sodio	NaCl
Comité De Nomenclatura De Muerte Celular	NCCD
Concentración citotóxica	CC
Concentraciones inhibitorias	IC
Difenilmetil selenocianato	DMSE

Dimetil sulfóxido	DMSO
Disección de los ganglios linfáticos axilares	ALND
Epirubicina	EPI
Especies reactivas de oxígeno	ROS
Étil éster tetrametilrodamina	TMRE
Extracto dializable de leucocitos de bovino	bDLE
Factor de crecimiento similar a la insulina	Igfl
Factor de necrosis tumoral alpha	TNFa
Glutación	GSH
Glutación peroxidasa	GPx
Glutación-S-transferasa	GST
Hidroetidina	HE
Immunepotent CRP	ICRP
Índice de combinación	CI
Leucemia linfocítica aguda	LLA
Lipopolisacárido	LPS
Líquido cefaloraquídeo	LCR
Lisado de amebocitos de <i>Limulus</i>	LAL
Medio Dulbecco's Eagle's modificado	DMEM-F12
Muerte celular dependiente de autofagia	ADCD
Muerte celular dependiente de lisosomas	LDCCD
Muerte celular inmunogénica	ICD
Muerte celular programada	PCD
Muerte celular regulada	RCD
N-acetilcisteína	NAC
Oxaliplatino	OMP
Patrones moleculares asociados a daño	DAMPs
Pérdida del potencial de membrana mitocondrial	$\Delta\Psi_m$
Polisacárido de <i>Ganoderma atrum</i>	PSG-1
Proteína B1 del grupo de alta movilidad	HMGB1
Proteína de choque térmico 90	HSP90

Q-VD-OPh	QVD
Receptor de estrógeno	ER
Receptor de factor de crecimiento epidermal	EGFR
Receptor de factor de crecimiento epidermal humano	HER2
Receptor de progesterona	PR
Receptor toll-like 4	TLR4
Receptores hormonales	HR
Respuesta patológica completa	CR
Retículo endoplásmico	ER
Suero fetal bovino	SFB
Superóxido dismutasa	SOD
Transición de permeabilidad mitocondrial	MPT
Unidad	U
Yoduro de propidio	PI



## RESUMEN

La quimioterapia es el tratamiento de primera línea contra cáncer de mama, a pesar de causar importantes efectos secundarios y de que las células tumorales desarrollan farmacorresistencia. Las principales propuestas actuales proponen su uso combinatorio con inmunoterapias, a fin de reducir las dosis requeridas para contrarrestar el proceso tumoral, los efectos secundarios y de prevenir la resistencia. En ese sentido, el Immunepotent-CRP (ICRP) es una inmunoterapia que *in vitro* ha mostrado inducir citotoxicidad sinérgica en combinación con ciclofosfamida (CYP), y mejorar la calidad de vida en pacientes con cáncer de mama cursando esquemas de quimioterapia convencional. Con base en lo anterior, el objetivo de esta tesis fue describir el mecanismo citotóxico del ICRP en combinación con CYP en células de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1) y su efecto sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMC) sanas. Para ello se analizaron el potencial citotóxico y características bioquímicas de muerte celular regulada (RCD), como alteraciones mitocondriales, activación de caspasas, alteraciones nucleares y morfológicas, así como la capacidad de exposición o liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs); además, se determinó el efecto de la combinación ICRP+CYP sobre PBMC.

Los resultados obtenidos permiten demostrar que el ICRP en combinación con CYP induce arresto del ciclo celular en células triple negativo (TNBC) y muerte celular potenciada que se caracteriza por inducir pérdida del potencial de membrana mitocondrial, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), activación de caspasas, degradación del ADN, cambios morfológicos, la exposición de calreticulina y liberación de ATP. Además, se determinó que la muerte celular inducida por el ICRP+CYP depende de la producción de ROS y no de las caspasas en células de cáncer de mama. Por otro lado, el ICRP no afectó la citotoxicidad inducida por la CYP sobre las PBMC.

Por todo lo anterior, se puede proponer a la combinación del ICRP con CYP como una terapia combinatoria efectiva, promoviendo su uso aún en células tumorales que tengan defectos en las proteínas implicadas en la vía de muerte apoptótica; y con potencial en el contexto de inductores de muerte celular inmunogénica.

## ABSTRACT

Chemotherapy remains a mainstay in breast cancer treatment, in spite of harmful adverse effects and that tumoral cells often became resistant. Current main proposes suggest the integration of immunotherapies in combined therapies in order to reduce the doses required for tumor eradication, to reduce adverse effects and to avoid treatment-resistance. From this perspective, IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) is an immunotherapy that has proven synergic cytotoxicity in combination with cyclophosphamide (CYP), besides increasing quality of patient's life during conventional chemotherapy. Based on the above, the objective of this thesis was to evaluate the mechanism of cytotoxicity induced by ICRP in combination with CYP in breast cancer cells (MCF-7, MDA-MB-231 and 4T1), and to determine the effect of the ICRP+CYP treatment in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). To this end, cytotoxic potential and regulated cell death (RCD)-biochemical characteristics were analyzed, such as mitochondrial alterations, caspases activation, cell death effectors, nuclear alterations and morphology phenotype, as well as damage associated molecular patterns (DAMPs)-exposure or release, beside, the effect of the ICRP+CYP combination in PMBC was determined.

The results obtained allow us to demonstrate that ICRP in combination with CYP induces cell cycle arrest in triple negative breast cancer cells (TNBC) and potentiated cell death that is characterized by the loss of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species (ROS) production, caspases activation, DNA degradation, morphologic changes, calreticulin exposure and ATP release. In addition, it was determined that ICRP+CYP-cell death is ROS-dependent in MDA-MB-231 and 4T1 cells, and caspases-independent in all of the breast cancer cells assessed. On the other hand, ICRP didn't affect CYP-cytotoxicity in PBMC.

For all the above, we can propose that the combination of ICRP with CYP is an effective combination therapy, promoting their use even in tumoral cells with defects on proteins implicated in the apoptotic-pathway; and as a therapeutic strategy with potential as an immunogenic cell death-inductor.

# 1. INTRODUCCIÓN

El término “muerte celular regulada” (RCD) se refiere a un tipo de muerte que se fundamenta en una dedicada maquinaria molecular que puede ser modulada mediante intervenciones farmacológicas o genéticas (Galluzzi et al. 2018). Es bajo este término que los tratamientos convencionales buscan atacar el cáncer, resaltando a las quimioterapias, las cuales continúan siendo la principal opción terapéutica para el cáncer de mama, incluyendo al subtipo TNBC, a pesar de los múltiples efectos secundarios (Bae et al. 2018). Las tendencias actuales proponen el uso de las terapias combinatorias, una modalidad de tratamiento que combina dos o más agentes terapéuticos los cuales potencian la eficacia del agente individual, fundamentado en inducir muerte en una manera sinérgica o aditiva. Este enfoque potencialmente reduce la resistencia a la muerte celular mientras que simultáneamente provee beneficios terapéuticos como la reducción de los efectos adversos (Mokhtari et al. 2017). Estudios actuales han revelado que además de la citotoxicidad de las quimioterapias, como la ciclofosfamida (un agente antineoplásico de primera línea para cáncer de mama), estos agentes también pueden provocar efectos inmunopotenciadores al liberar antígenos tumorales, facilitando su interacción con inmunoterapias, por lo que la integración de estos métodos potencialmente complementarios representa una efectiva estrategia contra el cáncer (Luo et al. 2019).

En ese sentido, el IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) es una inmunoterapia que *in vitro* ha demostrado inducir efecto citotóxico en diversas líneas celulares incluyendo las líneas de cáncer de mama: MCF-7, BT-474 y MDA-MB-453 y sin afectar la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica (Franco Molina et al. 2006). Estudios evidenciaron que el ICRP induce muerte celular regulada dependiente de ROS e independiente de caspasas en células HeLa, y A549, caracterizada por daño mitocondrial, producción de ROS, y arresto del ciclo celular en fase G2/M (Martínez Torres et al. 2018, 2019).

En relación con la quimioterapia, estudios en fase clínica con el ICRP han demostrado que es capaz de mejorar la calidad de vida en pacientes con cáncer de pulmón y cáncer de mama que cursaban esquemas de quimioterapias convencionales, observando un aumento de los leucocitos totales y las subpoblaciones de los linfocitos (Franco Molina et al. 2008;

Lara et al. 2010). Además, el ICRP ha demostrado inducir mieloprotección en modelos murinos tratados con 5-fluoracilo (Coronado Cerda et al. 2016).

Posteriores estudios demostraron que el tratamiento con la combinación de ICRP con oxaliplatino (OXP) incrementó el efecto citotóxico en contra de la línea de melanoma murino, B16F10, inducido por ambos agentes de manera independiente. Además, el tratamiento con ICRP indujo la exposición y liberación de DAMPS que se incrementó con la combinación de ICRP+OXP (Rodríguez Salazar et al. 2017).

Más recientemente, se evaluó el efecto sinérgico del ICRP en combinación con quimioterapias de primera línea en cáncer de mama, ciclofosfamida (CYP) y epirubicina (EPI) en las líneas humanas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, evaluando la inhibición, la muerte y la morfología celular de combinaciones no constantes y constantes de ICRP con CYP o EPI, mostrando que en contraste con los agentes individuales, la combinación de CYP o EPI con ICRP incrementó sinérgicamente la inhibición de la viabilidad en ambas líneas celulares (Guzman Aguillón 2018).

Finalmente, en otro estudio reciente se determinó que el ICRP en combinación con la poliquimioterapia Doxorrubicina/Ciclofosfamida es capaz de modular el microambiente tumoral, al tiempo que disminuye el volumen tumoral y prolonga la sobrevida en un modelo murino de cáncer de mama TNBC (Santana Krimskaya et al. 2020).

Estos resultados ofrecen evidencia de los efectos benéficos del ICRP en combinación con quimioterapia, al incrementar su efecto citotóxico; abriendo una nueva ventana terapéutica para el tratamiento del cáncer de mama.

Por lo que esta tesis se enfocó en dilucidar el mecanismo molecular de la sinergia inducida por el ICRP en combinación con ciclofosfamida con el fin de tener mayores bases para promover su utilización y sus beneficios.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Cáncer

De acuerdo con la OMS, el cáncer es el proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células y representa una de las principales patologías a nivel mundial (OMS, Cáncer, 2020). Existen múltiples mecanismos que conducen al desarrollo y progresión tumoral.

Los “sellos distintivos del cáncer” descritos por Hanahan y Weinberg en el 2011 proveyeron un mayor entendimiento de la complejidad de las enfermedades neoplásicas y su conocimiento, puede conducir a múltiples aplicaciones de estos conceptos, como el desarrollo de nuevas formas de tratar el cáncer. Estos sellos incluyen señalización proliferativa sostenida, evasión de los supresores de crecimiento, evasión a la destrucción por el sistema inmune, adquisición de inmortalidad replicativa, inflamación promovida por el tumor, activación de invasión y metástasis, inducción de angiogénesis, inestabilidad genómica, evasión de apoptosis y desregulación energética celular.

Estos sellos distintivos se ilustran en la figura 1.



**Figura 1. Sellos distintivos del cáncer.** Modificado de Hanahan y Weinberg, *Cell* 2011. Fuente: Sánchez N., 2013

Los cinco tipos de cáncer que causan un mayor número de fallecimientos son los siguientes:

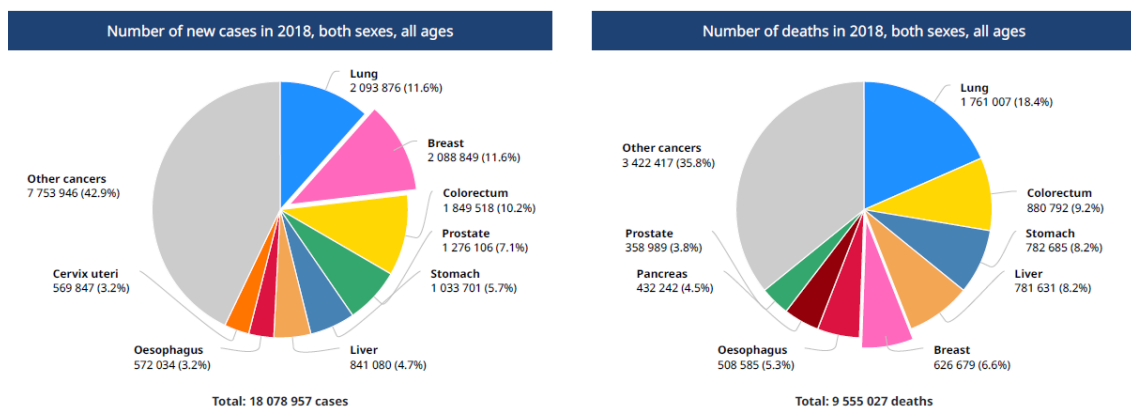
- Pulmonar (18.4%)

- Colorrectal (9.2%)
- Gástrico (8.2%)
- Hepático (8.2%)
- Mamario (6.6%) (OMS, 2018).

Cabe señalar que la incidencia de cáncer de mama está aumentando en el mundo. Aunque reducen en cierta medida el riesgo, las estrategias de prevención no pueden eliminar la mayoría de los casos de cáncer de mama que se dan en los países de ingresos bajos y medios, donde el diagnóstico se hace en fases muy avanzadas.

Las estrategias de detección precoz recomendadas para los países de ingresos bajos y medios son el conocimiento de los primeros signos y síntomas, y el cribado basado en la exploración clínica de las mamas y mediante mamografías (OMS, 2018).

En la figuras 2, se presentan algunas cifras relacionadas al perfil oncológico a nivel mundial.



**Figura 2. Número de casos nuevos y de mortalidad por cáncer en ambos sexos y todas las edades a nivel mundial. (OMS, Cáncer, 2018)**

## 2.2 Cáncer de mama

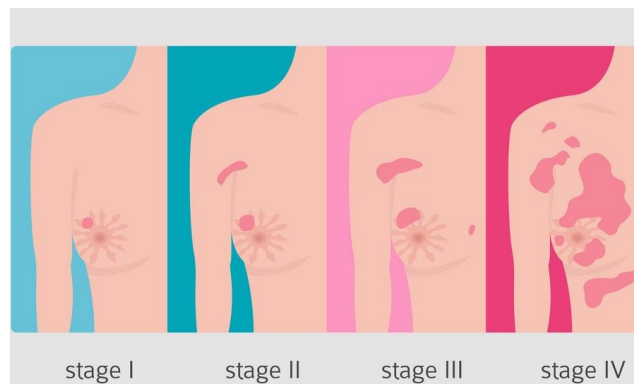
El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea producida por la interacción entre múltiples factores (García Foncillas, 2001), es el tipo de cáncer más común entre las mujeres en todo el mundo, pues representa el 16% de todos los cánceres femeninos (OMS, 2018).

En el cáncer de mama la extensión del cáncer al momento del diagnóstico, determina el estadio, el cual es esencial para los lineamientos de las opciones terapéuticas y pronóstico, la cual recae también en la presencia de receptores de estrógeno (ER),

receptores de progesterona (PR), los niveles de receptor de factor de crecimiento epidermal humano (HER2, una proteína promotora de crecimiento) y/o sobreexpresión del gen HER2. De acuerdo con el sistema de estadificación, el cáncer de mama se puede clasificar en:

- *In situ*, se refiere a la presencia de células anormales que están confinados en la capa de células donde se originaron.
- Local, se refiere al cáncer invasivo que está confinado en la mama.
- Regional, se refiere al cáncer que se ha esparcido al tejido circundante y/o ganglios linfáticos cercanos.
- Distante, se refiere al cáncer que se ha esparcido a órganos distantes y/o nódulos linfáticos, incluyendo nódulos arriba de la clavícula (ACS, 2019).

Estos estadios se ilustran en la figura 3:



**Figura 3. Clasificación convencional de los estadios de cáncer de mama.** Ridah, 2019

A su vez, el cáncer de mama se puede agrupar según la clasificación patológica convencional que las asocia de acuerdo con su histología en: lesiones *in situ* y lesiones invasivas. Las lesiones *in situ* (que no traspasan membrana basal), se dividen en carcinoma ductal in situ (DCIS) y carcinoma lobular in situ (LCIS) (Li C. et al. 2005). LCIS generalmente se considera como una condición benigna sin el potencial para progresar a cáncer invasivo. Por otra parte, DCIS es un precursor de cáncer invasivo, aunque no todos progresan. Las lesiones invasivas agrupan un conjunto de aproximadamente 81% de los cánceres de mama infiltrantes, lo que significa que las células anormales han roto la pared de las glándulas o ductos donde se originaron y crecen alrededor del tejido mamario; el más común es el carcinoma lobular invasivo, representando cerca del 15% de los cánceres

invasivos, además de carcinoma tubular, mucinoso, cribiforme, papilar e inflamatorio, los cuales no son comunes, pero están asociados con prognosis favorables (ACS, 2019).

La heterogeneidad celular y molecular del cáncer de mama y el largo número de genes involucrados en el control del crecimiento, diferenciación y muerte celular alterados, enfatiza la importancia de estudiar las alteraciones génicas en conjunto. Gracias a tecnologías que permiten identificar la expresión simultánea de genes múltiples (microarray), en el año 2000, Perou y colaboradores iniciaron el estudio de la expresión génica del cáncer de mama y lograron caracterizar esta enfermedad altamente heterogénea en cuatro principales subtipos moleculares, los cuales recibieron el nombre de subtipos “intrínsecos” (Perou, et al., 2000).

### 2.2.1 Subtipos moleculares de cáncer de mama

#### 2.2.1.1 Luminal A (ER+ PR+ HER2-)

Es el subtipo molecular de cáncer de mama más común y tiende a ser de proliferación más lenta y menos agresivo que otros subtipos. Los tumores Luminal A están asociados con la prognosis más favorable en parte porque usualmente responden a la terapia hormonal. Tiene un porcentaje de sobrevivencia de 92%.

#### 2.2.1.2 Luminal B (ER+ PR +/- HER2+)

Además de ser receptores hormonales positivos (HR+), este subtipo fue originalmente caracterizado por siempre ser positivo a HER2 (HER2+), pero más recientemente ha sido definido por ser altamente positivo para la proteína Ki67 (un indicador de un gran número de células dividiéndose activamente) y/o HER2. Los cánceres Luminal B, tienden a ser más agresivos que los luminal A y además están asociados con pronósticos pobres. Tiene un porcentaje de aprox. 89%.

#### 2.2.1.3 Her2 enriquecido (ER- PR- HER2+)

En el pasado, este subtipo tenía la peor prognosis; sin embargo, el amplio uso de terapia dirigida para cánceres HER2+ ha incrementado substancialmente el pronóstico para estos pacientes. Su porcentaje de sobrevivencia es de aproximadamente 83%.

#### 2.2.1.4 Basal-Like (ER- PR- HER2-)

Este subtipo es también llamado cáncer de mama triple negativo (TNBC) porque son receptor estrógeno y progesterona negativos y HER2 negativo. La mayoría (cerca del



75%) de los TNBC recaen dentro del subtipo basal-like definido por el perfil de expresión génica. TNBC tienen el más pobre pronóstico de los otros subtipos, en parte porque los avances en el tratamiento han quedado rezagados con respecto a otros subtipos moleculares (ACS, 2019). Tiene un porcentaje de supervivencia de 77% aprox.

Sorlie en el 2003, utilizó esta clasificación para agrupar los subtipos moleculares conforme su respuesta al tratamiento en: *i) neoplasias de bajo grado o “luminales”* (por su semejanza en la expresión génica con las células endoteliales del lumen ductal), aquellas que expresan RE y RP; y en *ii) neoplasias de alto grado o “basales”*, semejantes a las mioepiteliales, aquellas que no expresan RE ni RP, pero en las cuales hay sobre-expresión o amplificación de HER2.

En 2010, Subik y colaboradores, partiendo de lo propuesto por Perou y colaboradores en 2000, caracterizaron la expresión genética de las líneas celulares de cáncer de mama existentes, catalogándolas en subtipos intrínsecos. Múltiples investigaciones correlacionan los resultados experimentales encontrados en líneas celulares con las muestras tumorales de pacientes catalogadas con el mismo subtipo molecular, ofreciendo materia prima fidedigna para la investigación traslacional de nuevos tratamientos en etapas preclínicas (Subik et al. 2010).

En ese sentido, la línea celular MCF-7, fue establecida en 1973 aislada de una efusión pleural de una mujer de 69 años con enfermedad metastásica. Es ER y PR positiva y pertenece al subtipo molecular luminal A. Es una línea pobremente agresiva y no invasiva, considerada por tener baja capacidad de migración y bajo potencial metastásico. La información disponible sugiere niveles elevados de inestabilidad genética en las células MCF-7, ya que contienen una fracción de células madre que pueden generar variabilidad clonal; se ha propuesto esto como explicación para la heterogeneidad de esta línea celular y como un modelo para la heterogeneidad de los tumores mamarios. Las células MCF-7 contienen cantidades significativas del receptor  $17\beta$ -estradiol y la expresión de PR es fuerte e incrementan la expresión de ER en la ausencia de estrógenos, además, se considera una línea celular que expresa moderadamente receptor de factor de crecimiento epidermal (EGFR). Las células MCF-7 exhiben características de epitelio mamario diferenciado; son positivas para marcadores epiteliales, tales como E-cadherina,  $\beta$ -catenina y citoqueratina 18 (CK18); y negativas para marcadores mesenquimales, tales como vimentina y actina de músculo liso

(SMA), también mantienen la expresión de otros marcadores moleculares específicos de capas epiteliales naturales, tales como las claudinas. Las células MCF-7 son deficientes de CD44 (un receptor de adhesión de superficie involucrado en la progresión y metástasis (Senbanjo y Chellaiah 2017)). Las células MCF-7 proliferan y forman colonias con forma epitelial poligonal típica en contacto cercano unas con otras. Además, esta línea celular tiene bajo potencial angiogénico (Comsa et al. 2015); además presenta mutaciones en CDKN2A y PIK3CA (Kenny et al. 2007).

Por otro lado, la línea celular MDA-MB-231 es una línea humana de cáncer de mama epitelial que fue establecida de la efusión pleural de una mujer caucásica de 51 años con adenocarcinoma mamario metastásico, y es una de las líneas celulares de cáncer más comúnmente usadas en laboratorios de investigación médica. Es altamente agresiva, invasiva y pobremente diferenciada, carece de expresión de ER, PR y de amplificación del HER2, fue inicialmente clasificada como del subtipo “basal”, sin embargo, ahora es reconocida como perteneciente el subtipo de TNBC que exhibe regulación a la baja de claudinas (3 y 4), baja expresión del marcador de proliferación Ki-67, enriquecida con expresión de marcadores asociados con la transición epitelial-mesenquimal y la expresión de características asociadas con células madre de cáncer mamario (MCSCs), tales como un fenotipo CD44+ CD24-/bajo (ECACC 2017; Ghuwalewala et al. 2016). Presenta mutaciones en BRAF, CDKN2A, Kras y p53. La morfología es estrellada, distinguida por su fenotipo invasivo en cultivo con prolongaciones que sirven como puente entre múltiples colonias celulares. Esta línea celular carece de E-cadherina, reflejando las interacciones célula-célula más limitadas observadas en las colonias celulares (Kenny et al. 2007). La línea MDA-MB-231 es altamente metastásica y ha sido reportada por migrar primariamente a hueso, pero ocasionalmente a cerebro, ovario y glándulas adrenales (Chen et al. 2019).

Mientras los modelos celulares humanos pueden aproximar el crecimiento tumoral primario, en los ratones la replicación del comportamiento es más problemático y algunas veces se pueden observar características inesperadas. En contraste, los modelos celulares tumorales murinos muestran características más similares a las observadas en pacientes con cáncer al momento de trasladarlas a análisis en modelos animales (Tao et al. 2008). La línea 4T1, es considerada como un modelo triple negativo, ya que además de que carece de receptores hormonales de estrógeno y progesterona, carece de la expresión de p53 (Sztalmachova et al. 2015). Originalmente fue una de 4 sublíneas derivadas del tumor 410.4, la cual fue aislada de un tumor mamario surgido espontáneamente de un ratón de la cepa

BALB/c criado con una madre C3H (BALB/ BfC3H). La línea 4T1 fue seleccionada sin mutagénesis por su resistencia a 6-thioguanina, presenta múltiples características que la hacen adecuada para experimentos en modelos animales (Pulaski y Ostrand-Rosenberg 2000) y ha sido usada incrementadamente en los últimos años debido a su alta propensión a hacer metástasis a pulmón, hígado y hueso, sitios conocidos por ser afectados en cáncer de mama humano. Las células 4T1 han sido descritas por ser migratorias e invasivas a pesar de la expresión del marcador epitelial E-cadherina (Chen et al. 2019). Es altamente tumorigénica y poco inmunogénica con características de crecimiento y metástasis de células tumorales similares a las de glándulas mamarias humanas en estadio IV. Morfológicamente, el carcinoma 4T1 muestra crecimiento epitelial maligno en arreglo sólido, caracterizado por la proliferación de células pleomórficas e índice altamente mitótico (Garcia et al. 2014).

Bajo este panorama, el diagnóstico correcto del cáncer de mama es esencial para poder prescribir un tratamiento adecuado y eficaz, porque cada subtipo requiere un protocolo específico que puede abarcar una o más modalidades, tales como la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia (OMS, 2018).

## **2.3 Tratamientos para cáncer de mama**

La decisión de tratamiento se tomando considerando la etapa y las características biológicas del cáncer, la edad del paciente, el estado y los riesgos y beneficios asociados con cada opción.

### 2.3.1 Cirugía

El objetivo principal de la cirugía es remover el cáncer y determinar su estadio. La cirugía terapéutica involucra mastectomía (remoción quirúrgica de la mama completa) o cirugía conservadora de mama (BCS). Con BCS (también conocida como mastectomía parcial), sólo el tejido canceroso, además un borde del tejido normal (margen del tumor), es removido. BCS generalmente no es una opción para aquellos con alta relación tumor-seno o cánceres inflamatorios o localmente avanzados. En la mayoría de los casos, BCS es seguido por radiación al seno; la mastectomía también puede ser seguida por radiación. La BCS y la mastectomía generalmente se acompañan de la extracción de uno o algunos ganglios linfáticos regionales de la axila para determinar si la enfermedad se ha

diseminado más allá del seno. Este procedimiento identifica los ganglios linfáticos a los que es más probable que el cáncer se disemine y se denomina biopsia de ganglios linfáticos centinela (SLNB). La presencia de células cancerosas en ganglios linfáticos aumenta el riesgo de recurrencia, por lo que los resultados del SLNB pueden ayudar a determinar si se necesitará más tratamiento. Algunas pacientes con cáncer de mama deben someterse a una cirugía más extensa de ganglios linfáticos, llamada disección de los ganglios linfáticos axilares (ALND) (ACS, 2019). La cirugía que involucra la linfa axilar debe ser realizada en todos los casos de carcinoma mamario invasor y se considerará opcional en los casos en los que los pacientes tienen tumores con pronóstico favorable, en los que la terapia adyuvante no se modificará, pacientes ancianos o con enfermedades asociadas graves (SS, 2009).

### 2.3.2 Radioterapia

La radioterapia es usualmente usada después de la cirugía para destruir células cancerosas remanentes en el cáncer, pared torácica o el área bajo el brazo y reduce el riesgo de recurrencia. BCS es casi siempre seguida de radioterapia a la mama. Algunos pacientes a los que se les realizó mastectomía también se benefician de la radiación si el tumor mide más de 5 cm, crece hacia los tejidos cercanos o si se encuentra cáncer en los ganglios linfáticos. La radioterapia se puede administrar como radiación de haz externo, radioterapia interna (braquiterapia) o una combinación de ambas. El método depende del tipo, estadio y ubicación del tumor, así como las características del paciente. La radiación de haz externo es el tipo estándar de radiación, mediante el cual la radiación de una máquina fuera del cuerpo se enfoca en el área afectada por el cáncer. La braquiterapia usa una fuente radioactiva colocada en catéteres u otros dispositivos que se colocan en la cavidad que queda después de BCS y a veces es una opción para pacientes con cánceres de seno en etapa temprana. La evidencia acumulada sugiere que la radioterapia administrada a dosis más altas durante menos días (conocida como irradiación parcial acelerada del seno) puede ser tan efectiva como la convencional (ACS, 2019).

Los pacientes con cirugía conservadora deben recibir radioterapia porque se reducen en promedio del 20-25% las posibilidades de recurrencia local o regional. Los pacientes con mastectomía, si el tumor mide más de 5 cm y/o con 4 o más ganglios positivos está indicada la radioterapia adyuvante (SS, 2009).

### 2.3.3 Terapia Hormonal

El estrógeno, una hormona producida por los ovarios además de otros tejidos, promueve el crecimiento de los cánceres de seno HR+. Los cánceres de seno HR+ pueden tratarse con terapia hormonal para bloquear los efectos del estrógeno en el crecimiento de las células de cáncer de seno (ACS, 2019).

Para las mujeres premenopáusicas, el tamoxifeno por 5 años es el tratamiento adyuvante estándar; sin embargo, para las mujeres posmenopáusicas, la primera línea de terapia endócrina adyuvante con inhibidores de aromatasas por 5 años es el tratamiento hormonal preferido (SS, 2009).

### 2.3.4 Terapia Dirigida

Hay múltiples medicamentos disponibles para el tratamiento del subtipo HER2+. Trastuzumab, el primer fármaco aprobado, es un anticuerpo monoclonal que se dirige directamente a la proteína HER2. Se han desarrollado varios medicamentos más nuevos que se dirigen a la proteína HER2 y se pueden usar en combinación con trastuzumab o en combinación con quimioterapias como el paclitaxel en pacientes con TNBC.

Además de estos tratamientos existen terapias sistémicas (que viajan a través del sistema circulatorio y trabajan a través de múltiples mecanismos) que cuando son dadas a los pacientes antes de la cirugía, son llamadas terapias neoadyuvantes, sin embargo, cuando son dadas a los pacientes después de la cirugía son llamadas terapias adyuvantes. Una terapia sistémica que es la principal opción terapéutica para mujeres con cáncer de mama metastásico y para el subtipo TNBC es la quimioterapia (ACS, 2019).

## **2.4 Quimioterapia**

La quimioterapia por definición es el tratamiento para el cáncer con agentes químicos o fármacos. Estos medicamentos son muy diferentes en su composición química, el esquema de tratamiento, la forma en que se administran, su efectividad para tratar ciertos tipos de cáncer y los efectos secundarios que podrían tener (ACS, 2019).

El beneficio de la quimioterapia depende de múltiples factores, incluidos el tamaño del tumor y la cantidad de ganglios linfáticos involucrados, así como el subtipo molecular.

Los cánceres de mama triple negativo y los HER2+ tienden a ser más sensibles a la quimioterapia que los tumores HR+ (ACS, 2019).

Las quimioterapias pueden agruparse por su mecanismo de acción, su estructura química y su relación con otros fármacos en:

#### 2.4.1 Agentes alquilantes

Los agentes alquilantes evitan que la célula se replique al dañar su ADN. Estos medicamentos funcionan en todas las fases del ciclo celular y se usan para tratar diferentes tipos de cáncer, incluidos los de pulmón, mama y ovario, así como leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple y sarcoma. Debido a que estos medicamentos dañan el ADN, pueden afectar las células de la médula ósea que producen nuevas células sanguíneas. Ejemplos de este grupo incluyen carboplatino, cisplatino, ciclofosfamida, ifosfamida, oxaliplatino, entre otros (ACS, 2019).

#### 2.4.2 Antimetabolitos

Los antimetabolitos interfieren con el ADN y el ARN al inhibir la síntesis e incorporación de ciertas bases nucleicas en el ADN, gracias a un mecanismo de antagonismo que encuentra su explicación en la analogía estructural con las bases implicadas (Coeffic et al 2002). Cuando esto sucede, el ADN no puede hacer copias de sí mismo y una célula no puede reproducirse. Se usan comúnmente para tratar leucemias, cánceres de seno, ovario y tracto intestinal, así como otros tipos de cáncer. Los ejemplos de antimetabolitos incluyen: 5-fluorouracilo (5-FU), 6-mercaptopurina (6-MP), Capecitabina (Xeloda), Gemcitabina (Gemzar), Metotrexato, Tioguanina, entre otros.

#### 2.4.3 Antibióticos antitumorales

Estos medicamentos funcionan cambiando el ADN dentro de las células cancerosas para evitar que crezcan y se multipliquen.

2.4.3.1 Antraciclinas: las antraciclinas son antibióticos antitumorales que interfieren con las enzimas involucradas en la copia del ADN durante el ciclo celular. Se unen con el ADN para que no pueda hacer copias de sí mismo, y una célula no puede reproducirse. Se usan ampliamente para una variedad de cánceres. Los ejemplos de antraciclinas incluyen: Daunorrubicina, Doxorrubicina, Epirubicina, entre otros. Una preocupación importante al administrar estos medicamentos es que pueden dañar permanentemente el corazón si se

administran en dosis altas. Por esta razón, en estos medicamentos se utilizan los límites de dosis de por vida (también llamados dosis acumulativas).

Los antibióticos antitumorales que no son antraciclinas incluyen: Bleomicina, Mitomicina-C, entre otros.

#### 2.4.4 Inhibidores de la topoisomerasa

Estas drogas también se llaman alcaloides vegetales. Interfieren con las enzimas llamadas topoisomerasas, que ayudan a separar las cadenas de ADN para que puedan copiarse. Los inhibidores de la topoisomerasa se usan para tratar ciertas leucemias, así como los cánceres de pulmón, ovario, gastrointestinal, colorrectal y pancreático. Los inhibidores de la topoisomerasa se agrupan según el tipo de enzima que afectan:

2.4.4.1 Los inhibidores de la topoisomerasa I (también llamados camptotecinas) incluyen: Irinotecan y Topotecan.

2.4.4.2 Los inhibidores de la topoisomerasa II (también llamados epipodofilotoxinas) incluyen: Etopósido (VP-16), Mitoxantrona (también actúa como antibiótico antitumoral) Tenipósido. Los inhibidores de la topoisomerasa II pueden aumentar el riesgo de un segundo cáncer.

#### 2.4.5 Inhibidores mitóticos

Los inhibidores mitóticos también se llaman alcaloides vegetales. Son compuestos derivados de productos naturales, como las plantas. Funcionan evitando que las células se dividan para formar nuevas células, pero pueden dañar las células en todas las fases al evitar que las enzimas produzcan proteínas necesarias para la reproducción celular. Ejemplos de inhibidores mitóticos incluyen los taxanos y alcaloides de la vinca. Los taxanos incluyen: Cabazitaxel, Docetaxel, Paclitaxel, entre otros.

Los alcaloides de la vinca incluyen: Vinblastina, Vincristina y Vinorelbina.

Se usan para tratar muchos tipos diferentes de cáncer, incluidos los de mama, pulmón, mielomas, linfomas y leucemias.

#### 2.4.6 Corticosteroides

Son hormonas naturales y medicamentos similares a las hormonas que son útiles en el tratamiento de muchos tipos de cáncer, así como de otras enfermedades. Los ejemplos de corticosteroides incluyen: Prednisona, Metilprednisolona y Dexametasona (ACS, 2019).

En México las instituciones de salud pública brindan el tratamiento para el cáncer de mama siguiendo las Guías de Práctica Clínica, cuyos esquemas se muestran en la fig. 4.

**CUADRO III CÁNCER DE MAMA, TRATAMIENTO DE ACUERDO A RECEPTORES POSITIVOS  
HER 2 NEGATIVO**

TAMAÑO DEL TUMOR	GANGLIO	RECEPTOR	HER 2	RECOMENDACIONES
Microinvasor	-	+	-	Vigilancia
Menor a 0.5 cm	-	+	-	Vigilancia
0.6 a 1 cm, bien diferenciado	-	+	-	Hormonoterapia adyuvante
0.6 a 1 cm, moderadamente y pobremente diferenciado o factores pronósticos desfavorables	-	+	-	Hormonoterapia adyuvante +/- QT
Mayor de 1 cm	-	+	-	Quimioterapia + Hormonoterapia adyuvantes
T1 – T3	+	+	-	Quimioterapia +Hormonoterapia adyuvantes

Factores pronósticos desfavorables: Invasión angiolinfática, alto grado nuclear o alto grado histológico (moderadamente o pobremente diferenciado)

**TRATAMIENTO CÁNCER DE MAMA RECEPTORES NEGATIVOS, HER 2 POSITIVO**

TUMOR	GANGLIOS	RECEPTOR	HER2	RECOMENDACIÓN
Microinvasor	-	-	+	Vigilancia
Menor de 0.5 cm	-	-	+	Vigilancia
0.6 a 1 cm	-	-	+	Quimioterapia adyuvante
Mayor de 1 cm	-	-	+	Quimioterapia adyuvante + trastuzumab
T1 – T3	+	-	+	Quimioterapia adyuvante + Trastuzumab

**TRATAMIENTO CÁNCER DE MAMA, RECEPTOR POSITIVO, HER 2 POSITIVO**

TUMOR	GANGLIOS	RECEPTORES	HER 2	RECOMENDACIÓN
Microinvasor	-	+	+	Vigilancia
Menor de 0.5 cm	-	+	+	Vigilancia
0.6 a 1 cm, bien diferenciado	-	+	+	Vigilancia
0.6 a 1 cm, moderadamente diferenciado con factores pronósticos adversos	-	+	+	Hormonoterapia +/- Quimioterapia adyuvantes
Mayor de 1 cm	-	+	+	Quimioterapia +Hormonoterapia adyuvantes+ Trastuzumab
T1 – T3	+	+	+	Quimioterapia +Hormonoterapia+Trastuzumab

Factores pronósticos desfavorables: Invasión angiolinfática, alto grado nuclear o alto grado histológico.

**TRATAMIENTO CÁNCER DE MAMA, RECEPTOR NEGATIVO, HER 2 NEGATIVO**

TUMOR	GANGLIOS	RECEPTORES	HER 2	RECOMENDACION
Microinvasor	-	-	-	Vigilancia
Menor de 0.5 cm	-	-	-	Vigilancia
0.6 a 1 cm	-	-	-	Quimioterapia adyuvante
Mayor de 1 cm	-	-	-	Quimioterapia adyuvante
T1 – T3	+	-	-	Quimioterapia adyuvante

**Figura 4. Tratamientos para cáncer de mama de acuerdo a los receptores. (SS, 2009)**



Como se describió, el mecanismo por el cual se contrarresta el proceso tumoral puede llevarse a cabo por diferentes vías, lo que desata ambigüedades al describir las vías a través de las cuales muere la célula. En ese sentido, desde un punto de vista conceptual, la muerte celular puede definirse como el cese permanente de las funciones vitales de una célula. Sin embargo, es difícil identificar el límite preciso entre una alteración reversible de la homeostasis celular y muerte, para lo que el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (NCCD) propuso tres criterios para identificar a las células muertas y cuatro procesos celulares que son considerados puntos no reversibles de una célula en proceso de muerte (se considera que una célula está comprometida a morir cuando reúne al menos dos puntos de no retorno al mismo tiempo), los cuales son:

Criterios morfológicos y moleculares para identificar a una célula muerta:

1. Pérdida de la integridad de la membrana plasmática.
2. Fragmentación celular, incluido el núcleo.
3. La fagocitosis de la célula muerta por células con actividad fagocítica.

Puntos de no retorno que identifican a una célula moribunda:

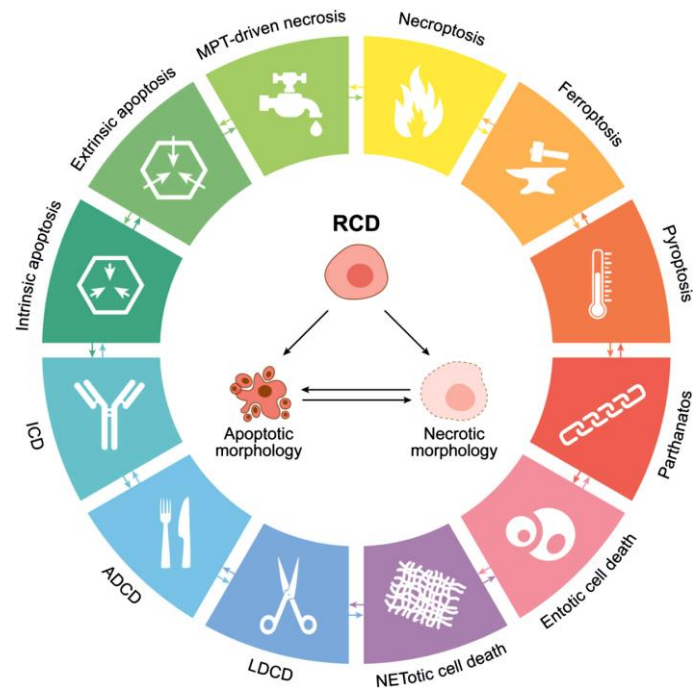
1. Activación masiva de proteasas de muerte (Por ejemplo, las caspasas).
2. Pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).
3. Permeabilización de la membrana mitocondrial.
4. Exposición extracelular de fosfatidilserina (Galluzzi et al. 2012).

Evidencia acumulada ha revelado y caracterizado con mayor detalle un conjunto de mecanismos genéticamente codificados de muerte clasificados por el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (NCCD) como muerte celular regulada.

## **2.5 Muerte celular regulada (RCD)**

La RCD se fundamenta en una dedicada maquinaria molecular, lo que implica que puede ser modulada (es decir, retrasada o acelerada) mediante intervenciones farmacológicas o genéticas. Esta muerte puede ocurrir en ausencia de cualquier perturbación ambiental exógena, por lo tanto, funciona como un efector incorporado de programas fisiológicos para el desarrollo o la renovación de los tejidos. Estas formas completamente fisiológicas de RCD generalmente se conocen como muerte celular programada (PCD). Por otro lado, la RCD puede también originarse a partir de

perturbaciones del microambiente intracelular o extracelular cuando tales perturbaciones son demasiado intensas o prolongadas para generar respuestas adaptativas que hagan frente al estrés y restauraren la homeostasis celular (Galluzzi et al. 2018). Dentro de la RCD, el NCCD clasifica las diferentes modalidades dependiendo de sus características bioquímicas, los cuales se ilustran en la figura 5.



**Figura 5. Principales modalidades de muerte celular regulada.** Células expuestas a perturbaciones del microambiente extracelular o intracelular irreversibles pueden activar cascadas de traducción de señal que son iniciadas o propagadas por mecanismos moleculares que exhiben un grado considerable de interconectividad, sin embargo, cada tipo de MCR se manifiesta con un espectro de características morfológicas. **ADCCD**: muerte celular dependiente de autofagia, **ICD**: muerte celular inmunogénica, **LDCCD**: muerte celular dependiente de lisosomas, **MPT**: transición de permeabilidad mitocondrial (Galluzzi et al. 2018).

Estas modalidades pueden ser clasificadas bioquímicamente dependiendo de caspasas, un grupo de cisteína aspartato proteasas que median o no el mecanismo de muerte; clasificando la MCR en dos grandes grupos: muerte celular dependiente de caspasas e independiente de caspasas, las cuales se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1. Modalidades de muerte celular regulada**

MODALIDADES DE MUERTE CELULAR REGULADA			
Tipo de muerte celular		Subtipos/ desencadena	Definición operacional
<b>Dependiente de caspasas</b>	<b>Apoptosis extrínseca</b>	Receptores de muerte celular (FAS, TNFR)	Iniciada por perturbaciones del microambiente extracelular, propagada por la CASP8, precipitada por caspasas efectoras, principalmente la CASP3.
	<b>Apoptosis intrínseca</b>	Mediada por estrés como daño al ADN, estrés oxidativo y estrés en el retículo	Iniciada por perturbaciones del microambiente extracelular o intracelular, determinado por MOMP y precipitado por caspasas ejecutoras, principalmente la CASP3.
	<b>Atípicas</b>	Anoikis: carece de dependencia de señal de la membrana externa	Variante de la apoptosis intrínseca iniciada por la pérdida de anclaje dependiente de integrina.
		Piroptosis: Es dependiente de la CASP1. Exhibe características morfológicas de apoptosis y necrosis.	Depende críticamente de la formación de poros en la membrana plasmática por miembros de la familia de proteínas gasderminas, frecuentemente como una consecuencia de la activación de caspasas inflamatorias.
		Muerte celular dependiente de lisosomas	RCD determinada primariamente por permeabilización lisosómica de la membrana y precipitada por catepsinas, con participación de MOMP y caspasas.
<b>Independiente de caspasas</b>	<b>Autofagia</b>	Vacuolización masiva del citoplasma desencadenado por inanición o estrés	RCD que depende de la maquinaria de autofagia o componentes del mismo. Induce lipidación MAP1LC3 y la degradación de SQSTM1.
	<b>Necrosis regulada</b>	Necroptosis: desencadenada por perturbaciones de la homeostasis extracelular o intracelular	RCD que depende críticamente de MLK1, RIPK3 y (al menos en una parte) de RIPK1.
		Partenatos	Iniciada por hiperactivación de PARP1 y precipitado por catástrofe bioenergética consecuente, acoplada a degradación del ADN dependiente de AIF y MIF.
		Necrosis impulsada por la transición de permeabilidad mitocondrial: desencadenada por perturbaciones del microambiente intracelular	Generalmente se manifiesta por un morfotipo necrótico y depende de CYPD.
		Ferroptosis: se produce por una falla en el sistema que no permite la quelación del hierro intracelular mediante aumento de ROS a través de la inhibición de glutatión (GSH) y pérdida de la función de de GPX4, peroxidación de lípidos, entrada de Ca <sup>2+</sup> y muerte celular.	Iniciada por perturbaciones del microambiente intracelular que está bajo control constitutivo por GPX4 y puede ser inhibida por quelantes de hierro y antioxidantes lipofílicos.
		Muerte celular por Netosis	RCD dependiente de ROS restringido a células de origen hematopoyética y asociado con extrusión de NET.
	<b>Atípicas</b>	Muerte celular entótica: es una forma de canibalismo celular que ocurre en tejido sano y maligno	Se origina a partir de la internalización célula a célula dependiente de actomiosina (entosis) y es ejecutado por lisosomas.

Modificado de (Martínez Torres et al. 2016; Galluzzi et al. 2018)

Dependiendo del estímulo inicial, las células moribundas, estresadas o lesionadas liberan o exponen moléculas en su superficie que pueden funcionar como adyuvantes o señales de peligro para el sistema inmune. Estas señales se denominaron patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) y se ha reportado que pueden tener un rol benéfico en la terapia contra el cáncer. Algunos DAMP se secretan o liberan (como el ATP y la proteína B1 del grupo de alta movilidad, HMGB1) y otros se exponen de novo o se enriquecen en la cara externa de la membrana plasmática (como la calreticulina, CRT, y la proteína de choque térmico 90, HSP90). La mayoría de estas moléculas tienen funciones predominantemente no inmunológicas dentro de la célula antes de su exposición en la superficie celular o su secreción (Krysko et al. 2012). Esta forma peculiar de muerte celular que se caracteriza por estimular respuestas inmunológicas en contra de los antígenos de las células moribundas, particularmente derivadas de células tumorales, se le conoce como muerte celular inmunogénica (ICD) (Kepp et al. 2014; Kroemer et al. 2013).

La CRT normalmente se localiza en el retículo endoplásmico (ER), pero cuando se expone a la membrana plasmática se ha demostrado que funciona como potente señal “cómeme”, lo que permite la fagocitosis de células tumorales en estrés o moribundas por las células dendríticas (DC) a través de su receptor CD91 (Kroemer et al. 2013). Además, la CRT puede estimular la producción de IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) y mejora la presentación del antígeno a los linfocitos T por parte de las DC, facilitando la polarización de los linfocitos Th1 (linfocitos que activan macrófagos, células dendríticas y células NK). Por esta razón, la CRT es la principal proteína de la ICD (Garg et al. 2015). La liberación extracelular de ATP en células moribundas es conocida como señal “encuentrame” y requiere la maquinaria de autofagia para ser transportada óptimamente (Krysko et al. 2012). Los efectos del ATP de promover el reclutamiento de células inmunes, incluidas las células dendríticas (Kroemer et al. 2013) al sitio y su diferenciación dependen del receptor purinérgico P2Y, acoplado a proteína G (P2RY2) (Kepp et al. 2014). En respuesta a la unión con el receptor, el ATP puede conducir a la activación del inflamosoma NLRP3, activación de la caspasa-1, por lo tanto estimular la maduración proteolítica y la secreción subsecuente de IL-1 $\beta$  e IL-18 (Kroemer et al. 2013).

La liberación de otros DAMP como HMGB1 parece ser más bien un evento pasivo debido a la desintegración de la membrana plasmática de las células tumorales en ICD.

Los DAMP se unen a receptores inmunes respectivos (TLR4 en células dendríticas para HMGB1/HSP70 y HSP90), (CD91 para HSP90) expuestos a la superficie. La interacción de los DAMPs con sus receptores facilita la internalización de los antígenos tumorales, producción de citosinas proinflamatorias y la presentación cruzada a las células T. Además, el HMGB1 extracelular también se ha demostrado que puede suprimir la actividad de las células inmunosupresoras como los linfocitos T reguladores (Garg et al. 2015). Sin embargo, hasta el momento, a tres DAMPs se les ha atribuido un papel clave en el potencial inmunogénico de prácticamente todo los inductores de ICD: la CRT, el ATP y HMGB1 (Kepp et al. 2014).

Esto fue propuesto por primera vez en el contexto de quimioterapia antitumoral, basado en evidencia clínica que indica que respuestas inmunes específicas de tumor pueden determinar la efectividad de las terapias contra cáncer con tratamientos citotóxicos convencionales (Kroemer et al. 2013). En ese sentido, la ciclofosfamida es una de las quimioterapias de primera línea para cáncer de mama con relevancia en torno a la capacidad de inducir ICD y por su capacidad inmunomoduladora (Schiavoni et al. 2010).

## **2.5 Ciclofosfamida (CYP)**

Es un agente alquilante indicado en el tratamiento de diversas neoplasias como son linfoma maligno, mieloma múltiple, leucemias, sarcomas, neuroblastoma, carcinoma ovárico y mamario, entre otros. También se utiliza para tratar enfermedad de Hodgkin y como inmunosupresor en lupus eritematoso, artritis reumatoide grave, vasculitis reumatoide y forma parte del régimen de acondicionamiento para trasplante de médula ósea (VADEMECUM 2015).

La ciclofosfamida interfiere en la función normal del ADN por alquilación e impidiendo la división celular mediante la formación de enlaces cruzados entre las cadenas de ADN, lo cual desequilibra el crecimiento celular y da por resultado la muerte celular. El fármaco se distribuye rápidamente tras su administración intravenosa por todo el organismo, incluidos encéfalo y líquido cefaloraquídeo (LCR). El medicamento cruza la placenta y es encontrado en la leche materna. La vida media plasmática de la ciclofosfamida fluctúa entre 4- 8 horas y el fármaco primordial y sus metabolitos se eliminan por la orina en proporciones de < 20% y 85- 90%, respectivamente (PLM 2018).

Luego de su absorción por vía digestiva, sufre una activación metabólica dependiente del sistema de citocromo P450 hepático (principalmente CYP 2B6 y 3A4 (Ahlmann y Hempel 2016)) (que genera una reacción de hidroxilación en el anillo de oxazoforina) formando 4-hidroxiciclofosfamida, un metabolito que se encuentra en equilibrio con su tautómero aldofosfamida. En las células tumorales, la aldofosfamida se cliva espontáneamente generando acroleína y fosforamida mostaza. Esta última sería la causante de los efectos citotóxicos. La actividad biológica de la ciclofosfamida se debe a la presencia de grupos bis-(2- cloroetil). Una de las cadenas 2-cloroetilo sufre ciclización intramolecular a través de la eliminación del cloruro para formar un catión aziridinio cíclico. Este catión altamente inestable es rápidamente atacado en uno de los átomos de carbono del anillo de aziridina de tres miembros por varios nucleófilos, como los residuos de guanina culminando en la alquilación de su nitrógeno 7. Esta reacción libera el nitrógeno del agente alquilante y lo hace disponible para reaccionar con el segundo lado de la cadena 2-cloroetil, formando un segundo enlace covalente con otro nucleófilo y la consecuente alquilación del nitrógeno 7 de los residuos de guanina del ADN (Emadi et al. 2009). En el ADN, la guanina se aparea con residuos de citosina, su base nitrogenada complementaria. Sin embargo al alquilarse, el residuo de guanina se vuelve más ácido y predomina la forma enólica. Durante la síntesis del ADN, la guanina modificada puede aparearse mal los residuos de timidina dando lugar a la sustitución del par de bases timina-adenina por guanina-citocina, resultando en el entrecruzamiento de dos cadenas de ácidos nucleicos y dando lugar a efectos mutagénicos. Además, la alquilación vuelve más lábil al anillo imidazólico haciendo que se abra o que la guanina sea escindida, causando graves daños en la cadena de ADN. Estos daños son censados dando lugar al inicio del proceso apoptótico (Lieberman et al. 2008).

A pesar de que el entrecruzamiento de ADN es considerado el responsable de la citotoxicidad de la CYP, el mecanismo de inicio y ejecución de la muerte celular es en gran parte desconocido (Goldstein et al. 2008). Sin embargo, se han reportado algunas de las características bioquímicas observadas en la muerte celular de la línea MCF-7 inducida por la CYP, demostrando que induce muerte por apoptosis con la presencia de exposición de fosfatidilserina y permeabilización de la membrana plasmática (en fases tardías) en un mecanismo que puede inducir arresto del ciclo celular dependiente de dosis en fase G0/G1,

S y G2/M. A dosis bajas (1-5 mM) se determinó acumulación de las células en fase G0/G1 en comparación con el control, lo que muestra un arresto del ciclo celular para que las células tengan el suficiente tiempo para reparar los daños, mientras que a concentraciones mayores el daño incrementa en un grado tan alto que el arresto es superado por muerte celular. Además se determinó un incremento en la actividad de las caspasas 8 y 9 en una manera dependiente de concentración, la cual se ve inhibida al usar el inhibidor de pancaspasas Z-VAD-FMK, así como el uso de este inhibidor previene la muerte inducida por la CYP, demostrando que la muerte depende específicamente de las caspasas. Por otro lado, el tratamiento con CYP condujo a un incremento de la proteína p53 activa que se relacionó con la regulación de otras proteínas a la alza como p21 y Fas, contrario a lo observado en la modulación del ratio Bax/Bcl-2, donde no se encontró cambios en la expresión. Sin embargo, se necesitan estudios más profundos para determinar la implicación de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis inducida por la CYP (Singh et al. 2009).

Para el tratamiento de tumores sólidos, la ciclofosfamida se administra vía intravenosa, las dosis convencionales son 400-1000 mg/m<sup>2</sup> sola o en combinación con 5-fluorouracilo, etopósido, metotrexato o doxorubicina. Los protocolos de terapias metronómicas usadas para el tratamiento de tumores sólidos y mieloma múltiple se administran diariamente en dosis de 25-100 mg de ciclofosfamida, algunas veces en combinación con citoestáticos u otros fármacos. Hasta ahora, los esquemas de terapia metronómica se aplican solamente en estudios clínicos de optimización terapéutica y no son considerados como terapia estándar (Ahlmann y Hempel 2016).

El tratamiento con ciclofosfamida puede promover con mayor o menor frecuencia efectos adversos como: leucopenia y trombocitopenia, cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, cistitis hemorrágica y nefrotoxicidad (todos estos efectos son dependientes de dosis altas), además se pueden presentar náuseas, alopecia y vómito (Ahlmann y Hempel 2016; PLM 2018 ).

La sensibilidad inherente de las células cancerosas a sufrir apoptosis después del daño en el ADN es el determinante más importante de la respuesta celular a la ciclofosfamida (Emadi et al. 2009). Sin embargo, desregulaciones en la maquinaria de muerte celular, pueden resultar en resistencia a la muerte celular, la cual está asociada con la

carcinogénesis. De hecho, la resistencia a la muerte celular es uno de los sellos distintivos de las células cancerosas (fig. 1). El mecanismo más común para evadir la muerte celular es la pérdida de la función de la proteína supresora de tumores (p53), simultáneamente, los tumores pueden alcanzar propósitos similares incrementando la expresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL), o las señales de sobrevivencia (como el factor de crecimiento similar a la insulina, Igf1/2), disminuyendo la expresión de proteínas proapoptóticas (Bax, Bim y PUMA), o bloqueando la vía extrínseca de la apoptosis inducida por ligandos de muerte. La estructura de la maquinaria de RCD y las estrategias usadas por las células cancerosas para evadir sus funciones, refleja la diversidad de las poblaciones celulares cancerosas encontradas durante la evolución al estado maligno (Hanahan y Weinberg 2011).

Esta evidencia convierte al sello de la resistencia a la muerte celular en uno de los principales blancos de las terapias contra el cáncer. En ese sentido, se ha introducido la terapia múltiple o combinacional en un intento por sobrepasar la resistencia que presentan las células tumorales a los tratamientos convencionales.

## **2.6 Terapia múltiple**

Aunque el enfoque de monoterapia sigue siendo una modalidad de tratamiento muy común para muchos tipos diferentes de cáncer, este método convencional generalmente se considera insuficiente. Además, la monoterapia es más susceptible a la resistencia a los medicamentos debido a que el tratamiento constante con un compuesto único induce a las células cancerosas a reclutar vías alternativas de rescate. Se requieren enfoques más nuevos que no se basen únicamente en el perfil de citotoxicidad tradicional de un solo agente para proporcionar una forma de terapia contra el cáncer más específica, eficiente y mejorada. Por lo tanto, la combinación de dos o más tratamientos terapéuticos que se dirigen a diferentes vías induciendo un efecto sinérgico o de potenciación es una piedra angular de la terapia del cáncer.

En la búsqueda de incrementar el efecto terapéutico de la quimioterapia con menores dosis, múltiples estudios de terapias combinatorias han sido publicados bajo este término. Aunque la terapia de combinación puede ser tóxica si uno de los agentes utilizados es quimioterapéutico, la toxicidad es significativamente menor porque se abordarán



diferentes vías. En última instancia, esto funciona de manera sinérgica o aditiva y, por lo tanto, se requiere una dosis terapéutica más baja de cada medicamento individual (Mokhtari et al. 2017).

Estas interacciones farmacológicas se clasifican en:

Aditivo: el efecto combinado de dos o más sustancias químicas equivale a la suma de los efectos aislados de cada una de ellas ( $2+2=4$ ).

Sinergia: el efecto combinado de dos o más sustancias químicas es mucho mayor que la suma de los efectos de cada sustancia por sí sola ( $2+2=10$ ).

Potenciación: es un tipo de particular de sinergia en el que una sustancia que no ejerce efecto alguno en determinada zona corporal aumenta los efectos tóxicos de otra sustancia en dicha zona. ( $0+2=10$ ).

Antagonismo: dos o más sustancias químicas interfieren en las acciones de cada una de ellas (o bien, una interfiere con la acción de la otra), por lo que el efecto combinado es menor que la suma de los efectos químicos individuales ( $2+2=3$ ) (CIDTA).

Chou y Talalay en 1983 introdujeron el término *índice de combinación (CI)*, el cual es una medida cuantificable del sinergismo o antagonismo de 2 o más drogas mediante una ecuación general para la combinación de dos o más fármacos, en donde, si el CI es igual a 1, se dice que es aditivo; si el CI es menor a 1, se describe sinergismo; y si el valor del CI es mayor a 1, se indica antagonismo. Los valores del sinergismo van de 0 al 1, y de antagonismo van de 1 al infinito (Chou y Talay 1983).

Basado en la inducción de sinergismo farmacológico, la terapia combinada puede prevenir los efectos tóxicos en las células normales y producir simultáneamente efectos citotóxicos en las células cancerosas. Esto puede ocurrir si un fármaco en el régimen de combinación es antagónico, en términos de citotoxicidad, al otro fármaco en células normales, protegiendo esencialmente a las células normales de los efectos citotóxicos (Mokhtari et al. 2017).

En ese sentido, diversos estudios se han realizado centrándolos en el efecto de quimioterapias convencionales capaces de inducir respuestas inmunitarias activadas por el mecanismo de muerte derivado del agente (entre ellas la ciclofosfamida) y en combinaciones con inmunoterapias, por su capacidad para mediar el inicio de una

respuesta inmune antitumoral, en la espera de nuevos regímenes terapéuticos (Wu y Waxman 2019).

## **2.7 IMMUNEPOTENT CRP (ICRP)**

El IMMUNEPOTENT CRP es un extracto dializable obtenido de la desintegración de leucocitos de sangre o de tejido linfoide homogeneizado de bazo de bovinos (bDLE) (Martínez T. et. al., 2018).

*In vitro* se ha descrito por su efecto citotóxico en diversas líneas celulares incluyendo las líneas de cáncer de mama: MCF-7, BT-474 y MDA-MB-453, clasificadas como Luminal A, Luminal B y HER2-enriched y sin afectar la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica. Se ha demostrado también que induce en MCF-7 fragmentación del ADN, la disminución de la expresión de mRNA de proteínas como p53, bag-1, c-myc, bim, bax, bcl-2 y bad (Franco Molina et al. 2006). Recientes estudios han evidenciado que el ICRP induce muerte celular regulada dependiente de ROS e independiente de caspasas en células de cáncer HeLa, y A549, caracterizada por daño mitocondrial, producción de ROS, arresto en el ciclo celular en fase G2/M (Martínez Torres et al. 2018, 2019).

En relación con la quimioterapia, estudios en fase clínica con el ICRP han demostrado que es capaz de mejorar la calidad de vida en pacientes con cáncer de pulmón y cáncer de mama que cursaban esquemas de quimioterapias convencionales, observando un aumento de los leucocitos totales y las subpoblaciones de los linfocitos T, CD4+, CD8+, CD16+ y CD56+ (Franco Molina et al. 2008; Lara et al. 2010).

Además, el ICRP ha demostrado inducir mieloprotección en modelos murinos tratados con 5-fluoracilo (5-FU), reduciendo la producción de ROS/superóxido y Nrf2 en células de médula ósea, manteniendo una cuenta de leucocitos, granulocitos y eritrocitos séricos normales (Coronado Cerda et al. 2016).

Posteriores estudios demostraron que el tratamiento con ICRP u oxaliplatino (OXP) indujo muerte celular en una línea de melanoma murino B16F10 y que el tratamiento con la combinación de ICRP+OXP incrementó el efecto citotóxico después de 24 horas de tratamiento *in vitro*. Además, el tratamiento con ICRP indujo la exposición de calreticulina y la liberación de ATP, HSP70, HSP90 y HMGB1, y la combinación de

ICRP+OXF incrementó la exposición y liberación de estos DAMPs, mientras que el tratamiento con OXF solo indujo la exposición de calreticulina y la liberación de ATP y HMGB1. Por otro lado, en los experimentos *in vivo* se demostró que la administración de lisados celulares tumorales derivados de células B16F10 tratadas con ICRP y la combinación de ICRP+OXF previno el crecimiento del melanoma; mientras que el lisado obtenido por el tratamiento con OXF no. Sugiriendo que el ICRP puede ser usado como un agente para incrementar la capacidad de los fármacos antitumorales para inducir muerte celular inmunogénica y prevenir el crecimiento de melanoma (Rodríguez Salazar et al. 2017).

Más recientemente, en otro estudio se evaluó el efecto sinérgico del ICRP en combinación con quimioterapias de primera línea en cáncer de mama, ciclofosfamida y epirubicina (EPI) en las líneas humanas de cáncer de mama del subtipo luminal A, MCF-7, y triple negativo, MDA-MB-231, evaluando la inhibición, la muerte y la morfología celular de combinaciones no constantes y constantes de ICRP con CYP o EPI, mostrando que en contraste con la CYP sola, la combinación con ICRP incrementa significativamente la inhibición de la viabilidad en ambas líneas celulares, obteniendo mejores resultados en la muerte celular. Mientras que la combinación de ICRP y EPI incrementó sinérgicamente la inhibición de la viabilidad en ambas líneas celulares, independientemente de los radios utilizados (Guzman Aguillón 2018).

Además, en un modelo murino de cáncer de mama TNBC, se probó el efecto del ICRP en combinación con Doxorubicina/Ciclofosfamida y su impacto sobre el microambiente tumoral, determinando disminución del volumen tumoral, aumento de la sobrevida y regulación de células CD8<sup>+</sup> a nivel tumoral y sistémico, así como supresión de moléculas como PD-L1, Gal-3 e IL-10 (Santana Krimskaya et al. 2020).

Estos resultados ofrecen evidencia de los efectos benéficos del ICRP en combinación con quimioterapia, al incrementar su efecto citotóxico; abriendo una nueva ventana terapéutica para el tratamiento del cáncer de mama.

### 3. JUSTIFICACIÓN

A la fecha, la quimioterapia es el tratamiento de primera línea para cáncer de mama, sin embargo, carece de selectividad hacia las células tumorales, provocando múltiples efectos colaterales al tiempo que desarrollan farmacorresistencia; por lo que se ha propuesto el uso de las terapias combinatorias con inmunoterapias que promuevan una sinergia a fin de reducir la resistencia a la muerte celular y de reducir los efectos adversos.

Desde este punto de vista, el IMMUNEPOTENT CRP es una inmunoterapia que ha demostrado inducir citotoxicidad potenciada en combinación con la ciclofosfamida, además de poseer un efecto inmunomodulador, por lo que representa un agente prometedor que brindaría la posibilidad de disminuir las dosis requeridas para contrarrestar el proceso tumoral y de prevenir los efectos adversos. Sin embargo, se carece de información en la literatura sobre el mecanismo de acción efectuado por la interacción farmacológica entre el IMMUNEPOTENT CRP y la ciclofosfamida en células de cáncer de mama, así como de su efecto en células sanas.

Con este estudio se pretendió dilucidar el mecanismo de la muerte celular inducida por el ICRP en combinación con CYP. Esto proporciona un precedente del efecto que produce dicha interacción y permite proponer nuevas aplicaciones u optimizar las condiciones en las que se utiliza.

#### **4. HIPÓTESIS**

El IMMUNEPOTENT CRP potencia el efecto citotóxico de la ciclofosfamida en células de cáncer de mama, afectando el ciclo celular y promoviendo la muerte celular, sin afectar su efecto en PBMC sanas.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Analizar el mecanismo de citotoxicidad inducido por la combinación del IMMUNEPOTENT CRP con ciclofosfamida en células de cáncer de mama y su efecto sobre PBMC sanas.

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Analizar el efecto citotóxico del ICRP, la CYP y la combinación ICRP + CYP, sobre las células MCF-7, MDA-MB-231, 4T1 y PBMC.
2. Evaluar las alteraciones mitocondriales inducidas por el ICRP, la CYP y la combinación ICRP + CYP sobre las células MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1.
3. Evaluar la actividad de caspasas en las células MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 tratadas con el ICRP, la CYP y la combinación ICRP + CYP.
4. Determinar la implicación de las caspasas y las ROS en la muerte celular inducida por el ICRP, la CYP y la combinación ICRP + CYP, sobre las células MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1.
5. Analizar las alteraciones nucleares y morfológicas inducidas por el ICRP, la CYP y la combinación ICRP + CYP sobre las células MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1.
6. Analizar la exposición y liberación de DAMPS en las células MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 tratadas con el ICRP, la CYP y la combinación ICRP + CYP.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Cultivos celulares

Las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1, fueron obtenidas del banco de líneas celulares del Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Las células fueron tratadas bajo los lineamientos de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA. USA), cultivadas en medio GIBCO™ Dulbecco's Eagle's modificado (DMEM-F12) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, previamente inactivado a 56°C durante 30 min, 2 mmol/L de l-glutamina y antibiótico al 1% de penicilina-estreptomicina (GIBCO by Life Technologies, Grand Island, NY, USA), evitando la contaminación de los cultivos celulares y medios. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera controlada de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> en frascos para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> (CORNING®).

Para realizar el mantenimiento, después de retirar el medio DMEM, se hizo un lavado del frasco de cultivo con las células, utilizando un buffer de fosfatos salinos (PBS) a un pH de 7.2, posteriormente se añadió tripsina-EDTA (GIBCO®) al 1%, dejándola actuar por 5 min a 37°C y se añadió medio DMEM-F12 para inactivar la tripsina. La suspensión celular recuperada se centrifugó por 10 min a 1,350 rpm, se realizó un conteo celular en una cámara de Neubauer mediante tinción con azul tripán (solución 0.4% SIGMA ALDRICH®) observándolas en un microscopio óptico (Zeiss Primo Star) y ajustando las células para el desarrollo del experimento correspondiente.

### 6.2 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Como control sano no tumoral para los experimentos de citotoxicidad, se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés *peripheral blood mononuclear cells*), mismas que fueron extraídas de donadores sanos, de los cuales se obtuvo una muestra de sangre de 6 mL en tubos con heparina de sodio. Para la separación de células por gradiente de densidad se realizó una dilución de la sangre 1:1 en PBS para posteriormente vaciar la dilución lentamente en tubos cónicos conteniendo un volumen de Ficoll atemperado (Histopaque®-1077), en una proporción 1:1. Una vez

realizada la dilución, se centrifugó por media hora a 1600 rpm en una centrífuga plana sin freno. Una vez que las células fueron separadas por gradiente mediante centrifugación, se visualizó la formación de capas celulares, de la cual se tomó la población correspondiente a las PBMC. Finalmente, las células fueron contadas con cámara de Neubauer y se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 10% (GIBCO®) ajustando la concentración celular a  $1 \times 10^5$  células por pozo para su utilización en el experimento correspondiente.

### **6.3 Elaboración del IMMUNEPOTENT CRP**

El IMMUNEPOTENT CRP ® (ICRP) es elaborado y distribuido por el LIV perteneciente a la FCB de la UANL. Es una mezcla heterogénea de moléculas de peso molecular de 10- 12 kDa obtenida de la diálisis de leucocitos de bazo bovino, el cual es homogenizado, dializado y liofilizado; después de su elaboración el ICRP pasa por una serie de pruebas de pirógenos endógenos, utilizando el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) y se verifica que esté libre de contaminación bacteriana mediante cultivo en diferentes medios, continuando con estudios de inoculación *in vivo* en ratones, para concluir con el empaquetado para su venta.

La unidad de medida utilizada para cuantificar el ICRP es la *unidad* (U) que se define como la cantidad de ICRP producido de la diálisis de  $1.5 \times 10^9$  leucocitos. El extracto fue disuelto en medio suplementado DMEM-F12 y almacenado a 4°C hasta su utilización.

### **6.4 Ciclofosfamida**

Se utilizó el agente quimioterapéutico Cryofaxol® (Cryopharma SA de CV) conteniendo 500 mg de ciclofosfamida (CYP) monohidratada que se utilizó a una concentración final 20 mg/mL.

El liofilizado de la ciclofosfamida se reconstituyó en medio suplementado DMEM-F12, para obtener una concentración molar de 76.6049 mM; se almacenó a -20°C protegido de la luz hasta su utilización y conservándolo a 4°C durante un periodo no mayor a 2 semanas.



## 6.5 Evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT

Para evaluar la sensibilidad de MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 al tratamiento con ICRP y CYP, se realizó un ensayo basado en la reducción metabólica de las sales de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el cual es un método colorimétrico que permite calcular el porcentaje de células metabólicamente activas (% de células viables) en un cultivo. Esta técnica se basa en que las células metabólicamente activas tienen la capacidad de reducir las sales de MTT formando cristales morados insolubles (cristales de formazán).

Para este ensayo, las líneas celulares MCF-7 y 4T1, y la línea MDA-MB-231 fueron sembradas a una concentración de  $5 \times 10^3$  y  $7 \times 10^3$  células/pozo respectivamente, empleando placas de 96 pozos de fondo plano (CORNING®) y se incubaron durante una noche para su adhesión bajo una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Tanto el ICRP (0.075- 1.45 U/mL), como la CYP (5- 50 mM) se añadieron ajustando las concentraciones a un volumen final de 200 µL/pozo, e incubaron durante 24 h. Al término del tratamiento, se descartó el sobrenadante invirtiendo la placa. Posteriormente se añadieron 80 µL de medio y 20 µL de MTT/ pozo, a una concentración final de 5 mg/mL suspendido en PBS y filtrado, se incubaron las placas a 37°C por 4 h, luego se eliminó el medio evitando remover las sales de formazán, finalmente se añadieron 100 µL/pozo de Dimetil sulfoxido (DMSO) (SIGMA-ALDRICH®) para resuspender el precipitado. La densidad óptica fue determinada en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 570 nm (Microplate autoreader BIOTEK, Instruments, Inc). Con los resultados obtenidos se determinó el porcentaje de viabilidad celular relativa empleando la fórmula que se muestra en la figura 6. De las curvas de dosis-respuesta obtenidas, se obtuvieron las concentraciones inhibitorias (IC) que sirvieron para experimentos posteriores.

$$\%VCR = \frac{\text{Densidad óptica de células tratadas}}{\text{Densidad óptica de células control}} \times 100$$

**Figura 6. Fórmula para determinar el porcentaje de viabilidad celular relativa.**

## 6.6 Análisis por citometría de flujo

La citometría de flujo es un tecnología biofísica que utiliza luz láser para el recuento y clasificación de células de acuerdo a sus características morfológicas o presencia de marcadores de superficie e intracelulares (Sapunar Goic, 1994).

En esta técnica las células se mantienen suspendidas en un fluido y atraviesan un tubo sobre el que incide un rayo de luz láser, la luz transmitida y dispersada por el pasaje de las células a través del tubo se detecta, y las sustancias químicas fluorescentes que se encuentran dentro o adheridas a la célula son excitadas hasta emitir luz a una longitud de onda mayor que la de la fuente de excitación, la fluorescencia también es recogida por los detectores; permitiendo inferir tamaño, complejidad y características físicas y químicas de las células individualmente.

Para alcanzar los objetivos propuestos en este estudio, se utilizaron los siguientes marcadores de fluorescencia:

- Anexina V y yoduro de propidio (AnnV/PI) (Análisis de muerte celular). Canal FL4 y FL2 respectivamente.
- Yoduro de propidio (PI) (Análisis de ciclo celular y degradación del ADN). Canal FL2.
- Étil éster tetrametilrodamina (TMRE) (Análisis de potencial de membrana mitocondrial). Canal FL3.
- Hidroetidina (HE) (Análisis de estrés oxidativo). Canal FL3.
- TF2-VAD-FMK (actividad de la activación de caspasas). FL1
- Anticuerpo anti-calreticulina acoplado a ficoeritrina (CRT-PE) (Análisis de exposición de calreticulina). Canal FL2.

Los cuáles serán descritos más ampliamente más adelante en esta sección.

Para cada uno de los análisis fueron consideradas 10,000 células por muestra. Todos los datos obtenidos por ensayos en citometría de flujo fueron analizados utilizando el software FlowJo.

### 6.6.1 Siembra de las líneas celulares

Para los ensayos de citometría de flujo se sembraron  $5 \times 10^4$  células MCF-7 y MDA-MB-231 y  $2.5 \times 10^4$  células 4T1/pozo en un volumen de 400  $\mu$ L placas de 24 pozos de fondo plano (CORNING). Las placas de cultivo se incubaron por 24h a 37°C con

atmósfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub> para permitir que las células se adhirieran a la placa. Por otro lado, las PBMCs fueron sembradas en placas de fondo redondo en volumen de 200 µL a una concentración de 1x10<sup>5</sup> células/pozo.

### 6.6.2 Ensayos

En todos los ensayos se utilizaron como control negativo células sin tratamiento y se evaluaron las características de las células después de ser tratadas con la CC1, 20 y 50 de ICRP y CYP, así como sus combinaciones en los radios 1+50, 50+1, 20+20 y 50+50, durante 12 y 24 h según corresponda.

A continuación se describirán los ensayos que se realizarán con la técnica de citometría de clasificación de células marcadas por fluorescencia (FACS):

#### 6.6.2.1 Ensayos de muerte celular

El marcaje simultáneo con Anexina V (AnnV) unida a alofococianina (ANN-APC) y Yoduro de Propidio (PI, por sus siglas en inglés, *propidium iodide*) (Molecular probes® by Life technologies™) permite la discriminación entre las células vivas y las células muertas. La AnnV tiene afinidad por la fosfatidilserina, un fosfolípido que usualmente se mantiene en la monocapa lipídica interior, pero cuando una célula sufre un proceso de muerte, la fosfatidilserina queda expuesta a la superficie de la célula funcionando como una señal cómeme para fagocitos y células vecinas, por otro lado la tinción con PI permite saber si la integridad de la membrana se ha perdido (muerte celular).

En este ensayo las células obtenidas en el paso de la recuperación (que será explicado más adelante) después de 24 h de tratamiento, fueron marcadas agregando 100 µL de buffer de unión de anexina (ABB, por sus siglas en inglés, *annexin binding buffer*) (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, en pH 7.4), ANN-APC (0.1 µg/mL) y PI (0.5 µg/mL), incubando los tubos durante 20 minutos a 4°C y posteriormente se analizaron por citometría de flujo (BD Accuri™ C6 Flow Cytometer) utilizando los canales FL-4 para anexina y FL-2 para yoduro de propidio.

Esta técnica se llevó a cabo para cumplir con los siguientes estudios:

- Análisis de la muerte celular inducida por el ICRP, CYP y sus combinaciones en células MCF-7, MDA-MB-231, 4T1 y PBMC.

- Análisis de la dependencia de caspasas y ROS en la muerte inducida en las células MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1, usando los inhibidores que se mencionarán posteriormente.

#### 6.6.2.2 Análisis del ciclo celular

El yoduro de propidio (PI) es un agente intercalante y una molécula fluorescente con una masa molecular de 668.4 Da que se puede utilizar para teñir el ADN de las células.. El conocer la cantidad de ADN dentro de las células nos puede indicar la fase del ciclo celular en la que éstas se encuentran.

Para este ensayo las células MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 fueron tratadas con la concentración de tratamiento que indujo el 20 y 50% de muerte celular (concentración citotóxica 50 o CC50) y con las combinaciones, y se incubaron durante 12 h; transcurrido este tiempo, las células se recuperaron y conservaron a -20°C (como se indica en el punto 6.6.3.2 de esta sección), fueron lavadas con PBS y centrifugadas durante 10 minutos a  $1.5 \times 10^3$  rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 µL de RNAsa a una concentración de 50 µg/mL, almacenándolas durante 20 minutos a temperatura ambiente y en obscuridad, posteriormente se agregaron 100 µL de yoduro de propidio a una concentración de 25 µg/mL y se almacenaron por 15 minutos a 4 °C en oscuridad. Finalmente, las células teñidas con PI fueron analizadas por citometría de flujo (BD Accuri TM C6 Flowcytometer) utilizando el canal FL-2.

#### 6.6.2.3 Evaluación del potencial de membrana mitocondrial

Para evaluar el potencial de membrana mitocondrial se utilizó el marcaje TMRE (Étil éster tetrametilrodamina), un fluorocromo que en células con potencial de membrana mitocondrial intacto es secuestrado. Cuando las mitocondrias pierden su potencial de membrana, el TMRE es liberado de la membrana, lo que produce un cambio en la intensidad de fluorescencia el cual es medido mediante citometría de flujo.

Para este ensayo, las células fueron sembradas y tratadas durante 24 h como se ha indicado en secciones previas. Posteriormente se recuperaron las células como se indicará en la sección correspondiente y se utilizaron 200 µL de marcaje (20 nM de TMRE) por muestra, en una atmósfera de 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, durante 30 min. Al finalizar el tiempo de incubación, cada muestra se lavó con 800 µL de PBS y se centrifugó nuevamente a 1600

rpm por 10 minutos. Se decantaron y agregaron 100  $\mu$ L de PBS para determinar la fluorescencia utilizando el canal FL-3.

#### 6.6.2.4 Análisis de las especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para evaluar la cantidad de especies reactivas de oxígeno generadas dentro de cada célula, se utilizará el marcaje HE (dihidroetidio, también llamado hidroetidina), exhibe fluorescencia azul en el citosol hasta que es oxidado por el anión superóxido y se intercala en el DNA, tiñendo el núcleo en fluorescencia roja que puede ser detectada mediante citometría de flujo (BD Accuri TM C6 Flowcytometer), en el canal FL-3.

Para este ensayo las células fueron sembradas como se indicó en la sección 6.6.1 y tratadas con los tratamientos independientes (CC1, 20 y 50) y la combinación durante 24 horas. Al finalizar el tiempo de incubación, se llevó a cabo la recuperación de células como lo indica la sección 6.6.3.1 y se aplicaron 2.5  $\mu$ M de HE por pozo, en una atmósfera de 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, protegido de la luz, durante 30 minutos, para realizar el marcado de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Cada muestra se lavó con PBS, posterior al cual se centrifugó nuevamente a 1600 rpm por 10 minutos, se decantaron y finalmente se agregaron 100  $\mu$ L de PBS para determinar la fluorescencia emitida mediante el citómetro de flujo.

#### 6.6.2.5 Evaluación de la activación de caspasas

Para detectar la actividad de caspasas tanto iniciadoras como efectoras se utilizó el Generic Caspase Activity Assay Kit, el cual utiliza el reactivo TF2-VAD-FMK como un indicador fluorescente de la actividad de caspasas. Este compuesto es permeable a las células y no tóxico que se une irreversiblemente a caspasas activas -1, -3, -4, -5, -6, -7, -8 y -9, una vez unido el compuesto es retenido dentro de la célula emitiendo una fluorescencia que puede ser detectada por citometría de flujo.

Después de transcurrir las 24 h de incubación de tratamientos, se añadieron 0.25  $\mu$ L de TF2-VAD-FMK en cada pozo y se incubó durante 4 horas a 27°C en atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub>, posterior a esto se recuperaron las células como se indica en la sección correspondiente, se centrifugaron a 1600 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante, las células se lavaron con 500  $\mu$ L de buffer de lavado y se centrifugaron nuevamente para suspender las células en 100  $\mu$ L de buffer de lavado o en PBS para analizar por citometría de flujo empleando el canal FL-1.

#### 6.6.2.6 Evaluación de la exposición de calreticulina

La exposición de calreticulina (CRT) en la superficie externa de la membrana plasmática es uno de los principales DAMPs, la cual sirve con una importante función como señal fagocítica, estimulando a los fagocitos a engullir las células tumorales muertas (Rodríguez Salazar et al. 2017).

Para este ensayo se utilizó la citometría de flujo para determinar los niveles de exposición de calreticulina inducida por los tratamientos después de 24 h. Las células recuperadas fueron marcadas con anticuerpo monoclonal de CRT acoplado a ficoeritrina (CRT-PE) (2 µg/mL) e incubadas por 1 h en FACS buffer (PBS + 2% SFB), se lavaron las muestras con PBS y se añadieron 100 µL de FACS buffer para analizarlas en el canal FL-2.

#### 6.6.2.7 Análisis de la dependencia de actividad de caspasas y ROS en la muerte celular

Para determinar la dependencia de la actividad de la caspasas en la vía de muerte inducida por los tratamientos, las células se trataron con la CC 1 y 50 de ICRP y la CC50 de CYP de manera independiente y sus combinaciones durante 24 horas. Este ensayo fue realizado pre-incubando las células en ausencia y en presencia del inhibidor QVD a una concentración de 10 µM por 30 minutos, debido a que el QVD es un químico que ha demostrado ser capaz de inhibir la actividad de las caspasas sin ser tóxico para las células (Caserta et al., 2003). Y posteriormente se analizó la muerte celular como se indica en la sección 6.6.2.1.

También se realizaron repeticiones para evaluar la dependencia de ROS en la muerte celular inducida por los tratamientos con células control y con tratamiento, en ausencia o pre-tratadas por 30 minutos con 5 mM del antioxidante N-acetilcisteína (NAC) (Sigma-Aldrich® Ref. A7250). La N-acetilcisteína actúa como donador de grupos sulfhidrilo reduciendo las ROS y es un precursor de glutatión (GSH), el principal antioxidante de las células (Samuni et al. 2013), posteriormente se analizó la muerte celular mediante marcaje con annexina V y yoduro de propidio como se indicó en la sección 6.6.2.1.

### 6.6.3 Recuperación de las células después del tratamiento

#### 6.6.3.1 Protocolo estándar de citometría de flujo

Durante todo el procedimiento los sobrenadantes y células se recuperaron en un mismo vial de 1.5 mL después de cada paso. Al terminar los tiempos establecidos de tratamiento,

se recuperó el sobrenadante de cada muestra, posteriormente se lavaron las células en el pozo con PBS, agregando después tripsina (GIBCO) diluida con PBS e incubándola durante 5 minutos, posteriormente se inactivó la tripsina con medio DMEM-F12 suplementado, se recuperaron las células despegadas y se lavó nuevamente con PBS. El vial con la suspensión de células recuperadas se centrifugó durante 10 minutos a 1600 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet fue utilizado para analizar las células con los marcadores descritos.

#### 6.6.3.2 Análisis del ciclo celular

Durante todo el procedimiento los sobrenadantes y células se recuperaron en un mismo tubo cónico de 15 mL después de cada paso. Al terminar los tiempos establecidos de tratamiento, se recuperó el sobrenadante, se lavaron las células con PBS, agregando después tripsina que se dejó actuar durante 5 minutos; posteriormente se inactivó la tripsina con medio DMEM-F12 suplementado, se recuperaron las células despegadas y se lavaron nuevamente con PBS. El tubo con la suspensión de células recuperadas se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet fue suspendido en etanol al 70% provocando la permeabilización de la membrana, para posteriormente almacenar los tubos a -20°C por una noche y en un periodo no mayor a 2 semanas.

### **6.7 Análisis de la liberación de ATP**

Las células fueron sembradas como se indica en la sección 6.6.1 y tratadas durante 24 h con la CC1 y 50 de ICRP, la CC50 de CYP y las combinaciones en los radios 1+50 y 50+50. Los sobrenadantes fueron usados para evaluar el ATP extracelular por ensayo de luciferasa (ENLITEN kit, Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se evaluó la bioluminiscencia en un lector de placas (Synergy HT, Software Gen5; BioTek, Winooski, VT, USA) a 560 nm.

### **6.8 Evaluación de la morfología celular**

Las células MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 fueron sembradas y tratadas durante 24 horas con los tratamientos y sus combinaciones como se indicó en la sección 6.6.1 y 6.6.2. A continuación se observaron los cambios morfológicos inducidos por el tratamiento en un

microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100) y se tomaron micrografías de campo claro (Lummera INFINITY 1-2 CMOS 2.0 MP Camera) con objetivo de 20X de los cambios morfológicos, así como los cambios en la confluencia celular.

## **6.9 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 7. Los resultados se representaron como gráficas que representan la media  $\pm$  desviación estándar de por lo menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las diferencias estadísticas se evaluaron usando la prueba t para muestras apareadas, considerando significativos los valores de p menores a 0.05.



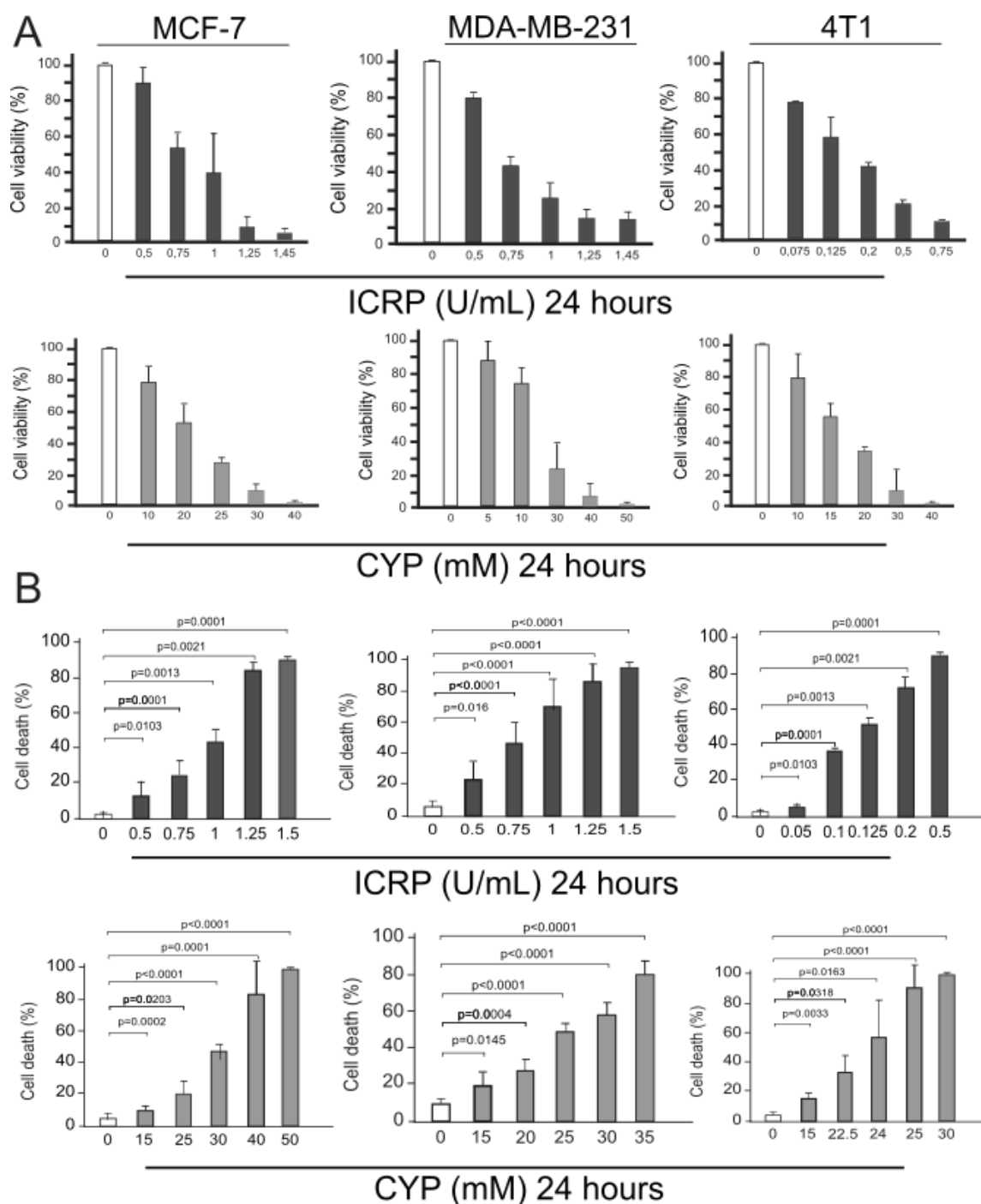
## 7. RESULTADOS

### 7.1 El ICRP y la CYP reducen la viabilidad e inducen muerte celular de las líneas MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1

Utilizando el método del MTT se determinó el efecto del ICRP y de la CYP sobre la actividad metabólica de las líneas tumorales estudiadas. Se determinó una reducción en la actividad metabólica de MCF-7, obteniendo a las 24 horas de tratamiento una IC<sub>50</sub> de 0.75 U/mL de ICRP y 20 mM de CYP, por otro lado, la inhibición celular del 50% MDA-MB-231 se obtuvo utilizando 0.6 U/mL de ICRP y 27.5 mM de CYP, mientras que para la línea 4T1 la IC<sub>50</sub> fue de 0.15 U/mL de ICRP y de 15 mM de CYP después de 24 horas de tratamiento (Fig. 7 A). Estos resultados indican que la actividad citotóxica del ICRP y de la CYP es dependiente de concentración y que la línea 4T1, de cáncer de mama murino, es la más sensible al tratamiento con ICRP, pero no a la CYP en comparación con las líneas MCF-7 y MDA-MB-231.

Debido a que el ensayo de MTT permite evaluar la viabilidad celular indirectamente al analizar el metabolismo celular, se decidió evaluar si los tratamientos eran capaces de inducir muerte celular utilizando un marcaje con Anexina V y con yoduro de propidio; a distintas concentraciones de los tratamientos durante 24 horas. Los resultados muestran; una CC<sub>1</sub> de 0.05, 0.3 y 0.05 U/mL de ICRP y de 2, 3, 2 mM de CYP en MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1, respectivamente. Por otro lado a las concentraciones de 0.6, 0.5 y 0.08 U/mL de ICRP y 25, 15 y 22.5 mM de CYP en MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1, respectivamente, se observó la CC<sub>20</sub> de los tratamientos. Además, se determinó la CC<sub>50</sub> del tratamiento con ICRP en 1.2, 0.75 y 0.125 U/mL y de CYP de 30, 27 y 24 mM en MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1, respectivamente (Fig. 7 B). Siendo la línea 4T1 más sensible al tratamiento con ICRP, no así para el tratamiento con CYP, en donde el efecto es similar a las otras 2 líneas tumorales.

Estas curvas de concentraciones permitieron determinar las CC que se emplearían en el diseño de las combinaciones, mismas que se resumen en la tabla 2.



**Figura 7. El tratamiento con ICRP y CYP reduce la viabilidad e induce muerte celular.** Las líneas MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 tratadas con diferentes concentraciones de ICRP (gris oscuro) y de CYP (gris claro) durante 24 h. **(A)** Viabilidad celular relativa determinada mediante MTT, considerando la absorbancia en el control como el 100%. **(B)** La muerte celular fue analizada mediante citometría de flujo utilizando el marcaje AnnV/PI. Los datos representan el promedio de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado  $\pm$ DE.

**Tabla 2. Concentraciones citotóxicas de ICRP y CYP en MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1.**

	ICRP (U/mL)			CYP (mM)		
	MCF-7	MDA-MB-231	4T1	MCF-7	MDA-MB-231	4T1
<b>CC1</b>	0.05	0.3	0.05	2	3	2
<b>CC20</b>	0.6	0.5	0.08	25	15	22.5
<b>CC50</b>	1.2	0.75	0.125	30	27	24

## **7.2 La combinación del ICRP con CYP induce muerte celular potenciada en MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1**

En la búsqueda por reducir al máximo las concentraciones de tratamiento, se llevaron a cabo combinaciones considerando las descritas previamente por Guzmán Aguillón en el 2018 para las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 por presentar un efecto sinérgico. Para ello se emplearon concentraciones de ICRP correspondiente a la CC1 (0.05, 0.3 y 0.05 U/mL) en conjunto con concentraciones de CYP, correspondiente a la CC50 (30, 27 y 24 mM) en MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1, respectivamente para analizar la muerte celular. Los resultados muestran el desplazamiento de la población hacia los cuadrantes indicativos de muerte celular (cuadrantes derechos y superiores, indicando un marcaje positivo para anexina V y yoduro de propidio, respectivamente) tanto en el tratamiento con ICRP (CC1) mostrado en la primer columna del lado izquierdo, como para el tratamiento con CYP (CC50) en la tercer columna de la parte central y para la combinación 1+50 en la primer columna del lado derecho para las líneas MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 (Fig. 8 A, B y C).

Tal combinación indujo la muerte celular en un porcentaje mayor al inducido por la ciclofosfamida sola, la cual aumentó la muerte de MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 a un  $90.1 \pm 2.98\%$ ,  $82.25 \pm 6.23\%$  y  $90.01 \pm 13.75\%$ , respectivamente, siendo este aumento significativo en las 3 líneas celulares (Fig. 8 D, E y F).

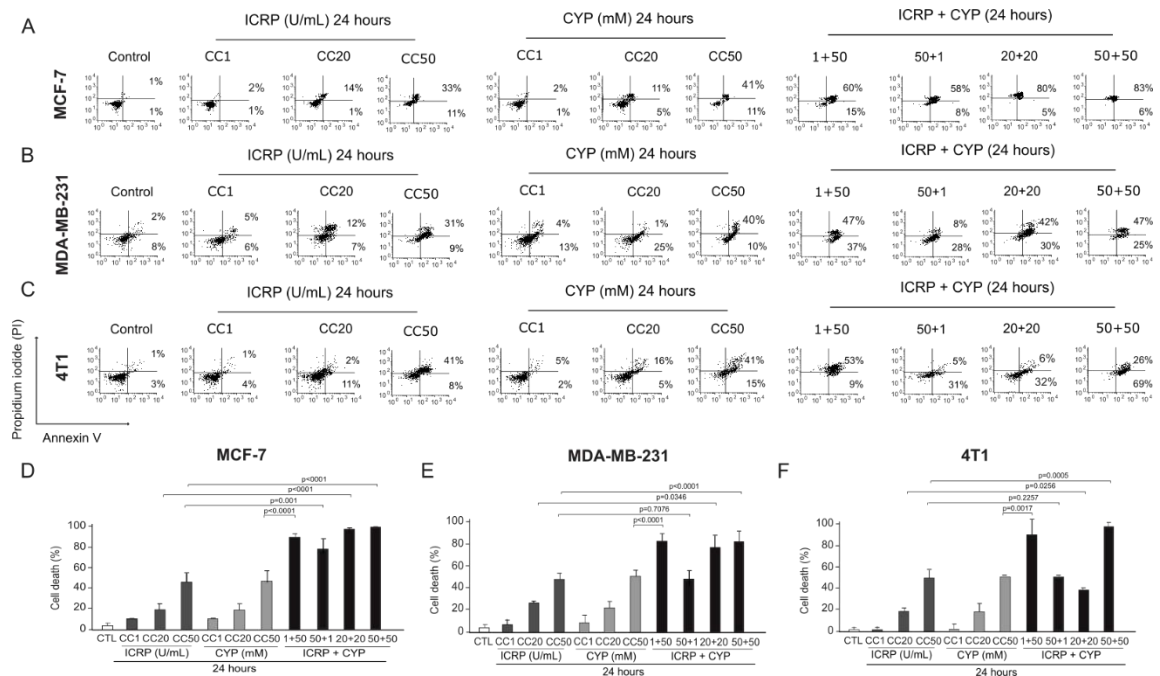
Se realizó además la combinación a la inversa, empleando la CC50 de ICRP (1.2, 0.75 y 0.125 U/mL) en conjunto con concentraciones mínimas de CYP correspondiente a la CC1 (2, 3, 2 mM) de MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1, respectivamente, la cual induce un aumento de las células positivas para anexina V y yoduro de propidio al tratarlas tanto con

la CC50 de ICRP (tercer columna del lado izquierdo), como con la CC1 de CYP (primer columna de la parte central), y para la combinación 50+1 (segunda columna del lado derecho) en las líneas MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 (Fig. 8 A, B y C). Esta combinación aumentó la muerte celular significativamente, hasta  $78.58 \pm 9.69\%$  en la línea celular MCF-7 (Fig. 8 D), mientras que en las células MDA-MB-231 y 4T1, se mantuvo la muerte celular en  $48.41 \pm 7.46$  y  $49.88 \pm 1.21\%$ , respectivamente (Fig. 8 E y F).

Por otro lado, se realizaron también combinaciones a radios constantes, empleando concentraciones equipotentes con la CC20 (0.6, 0.5 y 0.08 U/mL) de ICRP y de CYP (25, 15 y 22.5 mM) respectivas de MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1. Los resultados muestran que tanto en el tratamiento con ICRP (CC20) (segunda columna del lado izquierdo), como el tratamiento con CYP (CC20) (segunda columna de la parte central) y para la combinación 20+20 (tercer columna del lado derecho), inducen un aumento de la población con marcaje positivo para anexina V y yoduro de propidio, respectivamente en las líneas MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 (Fig. 8 A, B y C).

Esta combinación indujo muerte celular hasta  $98.11 \pm 1.07$ ,  $77.14 \pm 9.69$  y  $39.45 \pm 2.31\%$  de MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 respectivamente, en un porcentaje mayor al inducido por el ICRP y la CYP de manera individual, siendo significativo en las 3 líneas celulares (Fig. 8 D, E y F).

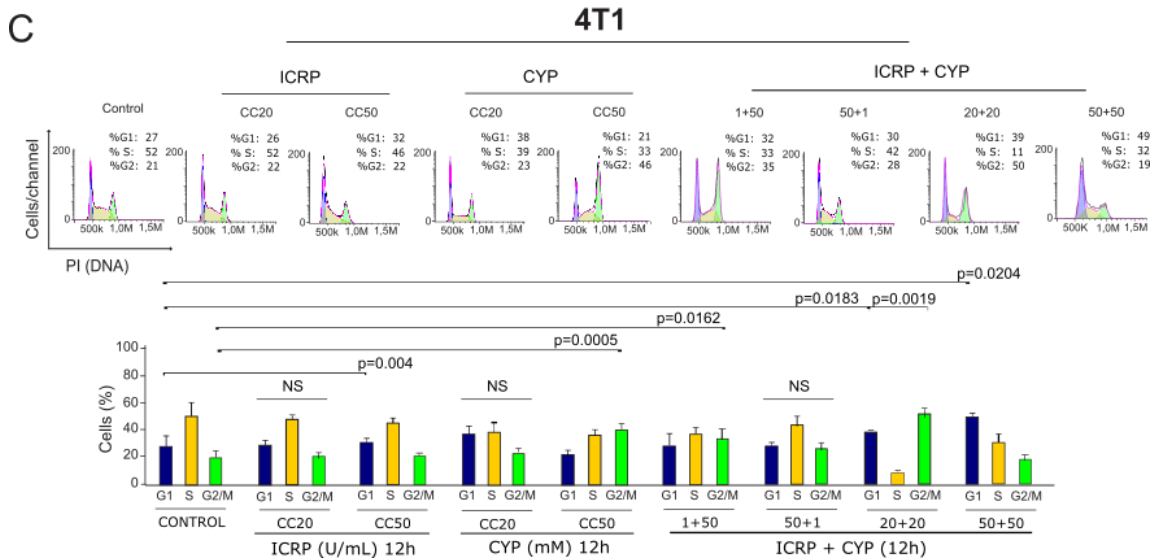
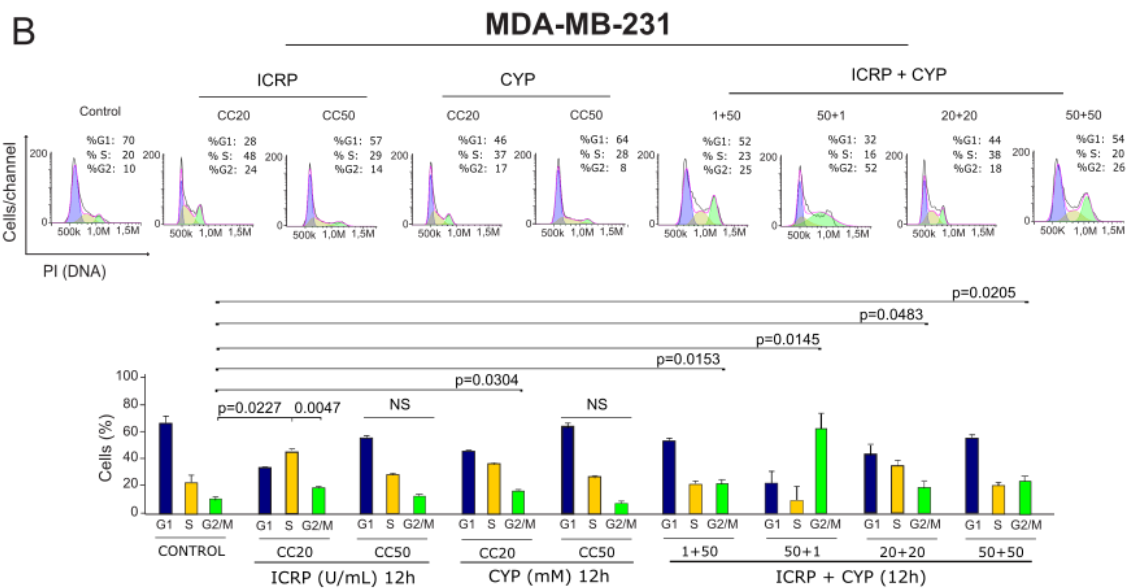
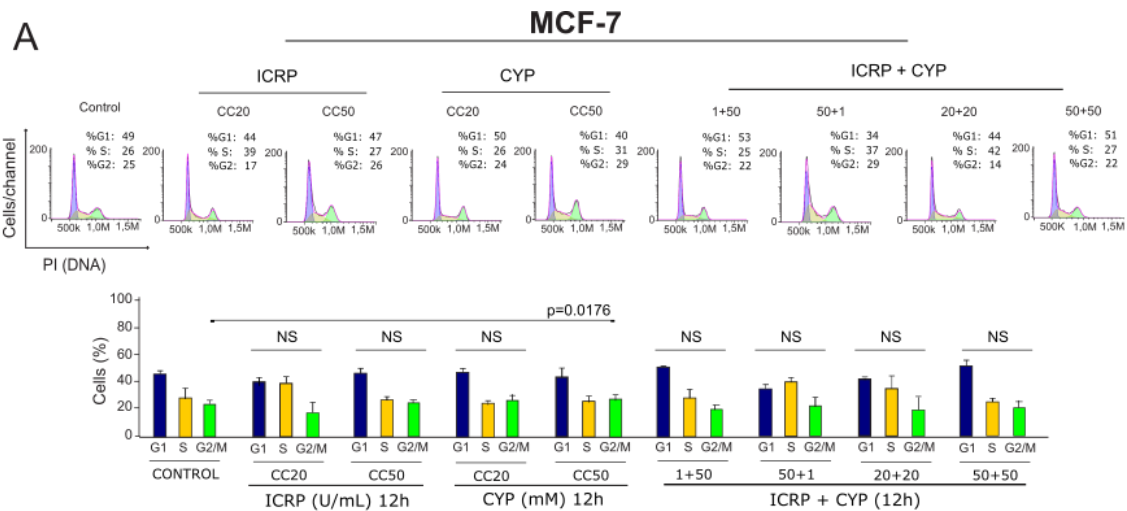
Por otro lado, al combinar la CC50 de ICRP (1.2, 0.75 y 0.125 U/mL) en conjunto con la concentración equipotente de CYP correspondiente a la CC50 (30, 27 y 24 mM) de MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1, se indujo marcaje positivo para la muerte celular al tratarlas tanto con la CC50 de ICRP (tercer columna del lado izquierdo), como con la CC50 de CYP (tercer columna de la parte central) y para la combinación 50+50 (cuarta columna del lado derecho) en las líneas MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 (Fig. 8 A, B y C). Esta combinación indujo muerte celular en un  $99.71 \pm 0.09$ ,  $81.89 \pm 9.25$  y  $97.06 \pm 2.57\%$ , siendo significativo para las 3 líneas celulares (Fig. 8 D, E y F).



**Figura 8. El ICRP en combinación con CYP induce muerte celular potenciada.** Las células MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) y 4T1 (C) fueron tratadas con la CC1, 20 y 50 de ICRP, CYP y la combinación de ambos tratamientos durante 24 h, posteriormente marcadas con AnnV/PI para el análisis de muerte celular. Dot plots obtenidos mediante citometría de flujo y gráficas del promedio de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado  $\pm$ DE en células MCF-7 (D), MDA-MB-231 (E) y 4T1 (F).

Para determinar si la citotoxicidad potenciada encontrada en el análisis de muerte era debida a alteraciones en el ciclo celular, se realizó un análisis mediante citometría de flujo marcando el ADN con yoduro de propidio. Los resultados muestran en color azul la población en fase G0/G1, en color amarillo la que se encuentra en fase de síntesis y en verde la población en fase G2/M; cabe mencionar que para este análisis no se tomó en cuenta la población en fase SubG1, que se consideró para análisis posteriores. Las células MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 fueron tratadas con sus concentraciones correspondientes a la CC20, CC50 (valores mostrados en la tabla 2) y las combinaciones en radios 1+50, 50+1, 20+20 y 50+50 durante 12 horas. De estos resultados, sobre la línea MCF-7 se observó que los tratamientos independientes con la CC20 o con las combinaciones no inducen cambio significativo en las poblaciones celulares, evidenciado en el histograma obtenido mediante citometría de flujo. Sin embargo, únicamente la CC50 de CYP indujo un aumento significativo en la cantidad de células en la fase G2/M con respecto al control (Fig. 9 A). Por otro lado, se determinó que el tratamiento con la CC20 de ICRP indujo un

incremento de la cantidad de células en fase S y G2/M; mismo que no se observó al usar la CC50 del mismo tratamiento; contrario a lo observado con ICRP, la CC20 de CYP no mostró inducir cambios en las poblaciones celulares, por otro lado, la CC50 sí logró inducir un incremento de la población celular en fase G2/M. Finalmente, al combinar los tratamientos se determinó que las 4 combinaciones probadas indujeron un aumento de la cantidad de células en fase G2/M sobre la línea MDA-MB-231 (Fig. 9 B). Además, en la línea 4T1, las CC20 del tratamiento con ICRP y CYP no indujeron cambios significativos de las poblaciones celulares. Fue hasta la CC50 de ICRP y CYP que se observó un aumento en las poblaciones en fase G1 y G2/M, respectivamente. Asimismo, al tratar las células con la combinación 1+50 se determinó un aumento significativo de células en fase G2/M, no observado por el tratamiento con la combinación 50+1. Al combinar los tratamientos en radio 20+20 se vio un aumento en fase G1 y G2/M, y al combinar las CC50 de los tratamientos se evidenció aumento significativo de la población en fase G1 (Fig. 9 C).



**Figura 9. El tratamiento con ICRP en combinación con CYP afecta el ciclo celular.** Las células tratadas con la CC20 y 50 de ICRP, CYP y la combinación de ambos tratamientos durante 12 h. El ADN fue marcado con yoduro de propidio. Histogramas obtenidos mediante citometría de flujo; en azul se muestra el porcentaje de células en la fase G0/G1, en amarillo las células en fase S y en verde las células en fase G2/M del ciclo celular y gráficas del promedio de tres experimentos independientes, analizados por triplicado  $\pm$ DE en MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) y 4T1 (C).

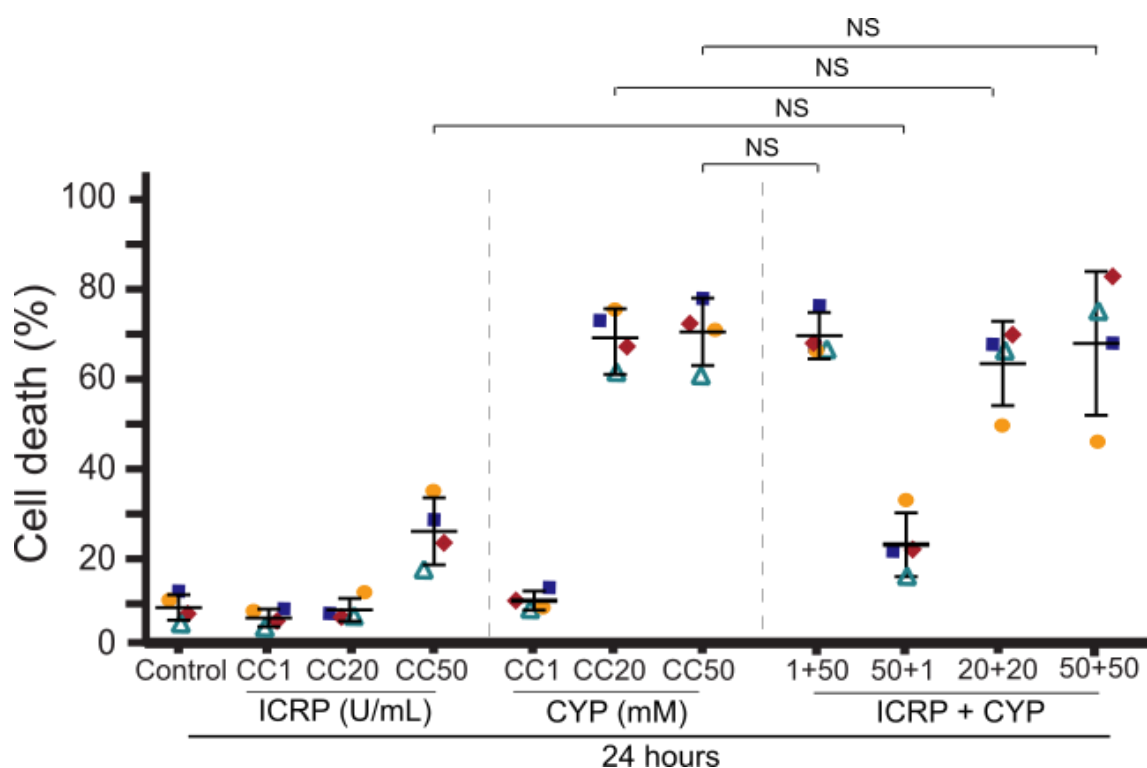
### **7.3 La combinación del ICRP con CYP no induce muerte celular potenciada de las PBMC en las concentraciones que presentan efecto antitumoral**

El uso de concentraciones terapéuticas o antitumorales de la quimioterapia ejerce diversos efectos secundarios en los pacientes con cáncer de mama, principalmente sobre células del sistema inmune, induciendo leucopenia y trombocitopenia. Lo anterior llevó esta investigación a probar si esta combinación farmacológica no potenciaba el efecto de la quimioterapia sobre las células mononucleares de sangre periférica.

Utilizando un marcaje con anexina V y yoduro de propidio se evaluó, sobre las PBMC, el efecto que tienen las combinaciones que inducían efecto antitumoral potenciado. En ese sentido, se emplearon las concentraciones de tratamientos más elevadas para los modelos tumorales, correspondientes a la línea MCF-7 (CC1 ICRP = 0.05 U/mL, CC20 ICRP= 0.6 U/mL y CC50 ICRP= 1.2 U/mL; CC1 CYP= 2 mM, CC20 CYP= 25 mM y CC50 CYP= 30, mM), durante 24h.

Los resultados muestran que los tratamientos con la CC1 tanto de ICRP, como de CYP, no indujeron muerte celular significativa, y tampoco la CC20 y 50 de ICRP, en donde la concentración más alta indujo la muerte de  $17.73 \pm 9.25\%$ ; sin embargo, para la CYP, desde concentraciones tan bajas como la CC20 se obtuvo un  $70.46 \pm 5.13\%$ , mientras que a la CC50 se observó un  $78.66 \pm 5.95\%$  de muerte, evidenciando la alta toxicidad de la quimioterapia sobre las células sanas. Las combinaciones 1+50, 50+1, 20+20 y 50+50 presentaron una muerte celular en PBMC de  $68.31 \pm 2.57$ ,  $20.68 \pm 6.98$ ,  $65.15 \pm 7.08$  y  $66.06 \pm 10.71\%$ , respectivamente (Fig. 10), porcentajes menores a los inducidos por la quimioterapia sola o sobre células tumorales.





**Figura 10. La combinación del ICRP con CYP no potencia la muerte celular de PBMC.** Las PBMC fueron tratadas con la CC1, 20 y 50 (concentraciones antitumorales) de ICRP, CYP y la combinación de ambos tratamientos durante 24 h, posteriormente las células fueron marcadas con AnnV/PI para el análisis mediante citometría de flujo. La gráfica representa el promedio de cuatro donadores sanos, analizados por triplicado  $\pm$ DE.

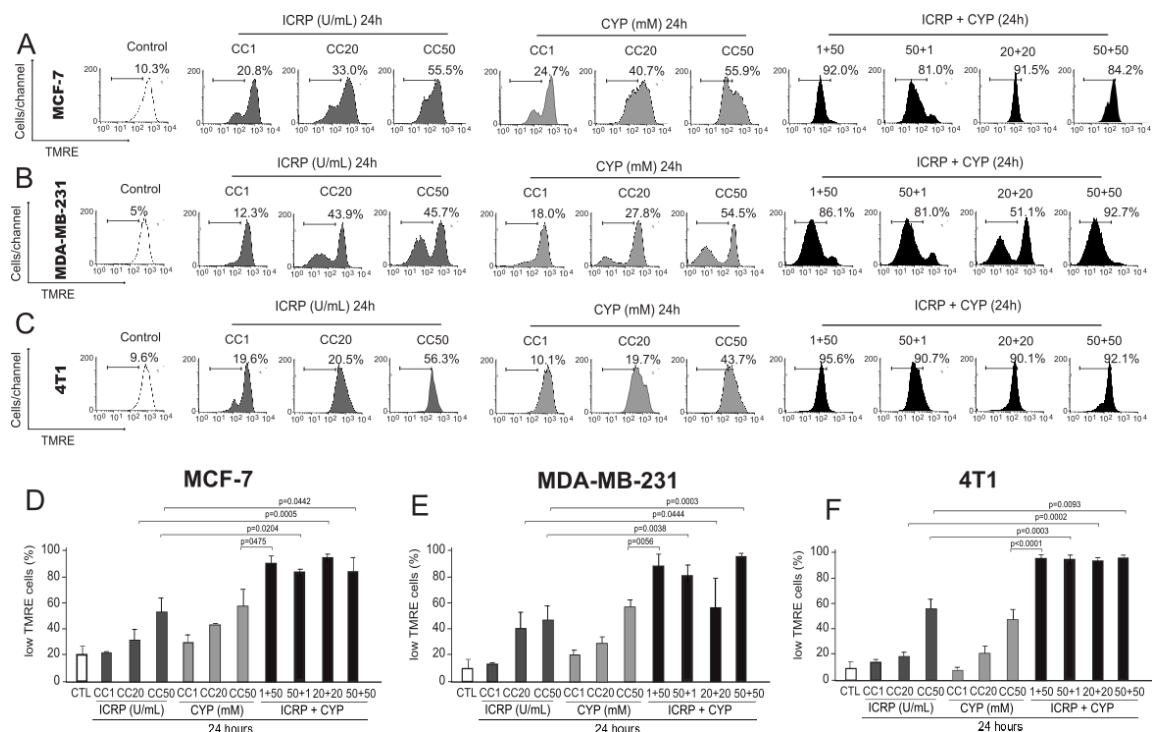
#### 7.4 El ICRP en combinación con CYP induce alteraciones mitocondriales en MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1

Las mitocondrias está involucradas en la regulación de la muerte celular por apoptosis, necrosis regulada y autofagia, por lo que para evaluar si el tratamiento con ICRP en conjunto con CYP induce disfunciones mitocondriales asociadas a la muerte celular, se empleó el marcaje con TMRE y se encontró que el ICRP (CC1, 20 Y 50) y la CYP (CC1, 20 Y 50), así como sus combinaciones en los radios constantes y no constantes (1+50, 50+1, 20+20, 50+50), inducen pérdida del potencial de membrana mitocondrial, cuando se aplican los tratamientos a las células MCF-7 (Fig. 11 A), MDA-MB-231 (Fig. 11 B) y 4T1 (Fig. 11 C), comparadas con el control. Al combinar la CC1 de ICRP con la CC50 de CYP durante 24 h, se indujo en MCF-7 una mayor pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $90.78 \pm 5.68\%$ ) comparada con el tratamiento individual de la CYP ( $57.9$

$\pm 12.65$ ). De esta misma forma, al combinar la CC50 de ICRP con la CC1 de CYP, se indujo la pérdida del marcaje en el  $84.1 \pm 1.84\%$  de la población celular, significativamente mayor a la del tratamiento individual con ICRP ( $53.9 \pm 10.83\%$ ). Además, se observó una pérdida del marcaje del  $94.95 \pm 2.81\%$  y  $84.33 \pm 10.99\%$  al combinar la CC20 de ICRP ( $32.32 \pm 7.67\%$ ) con la CC20 de CYP ( $43.96 \pm 0.56\%$ ) y la CC50 de ambos tratamientos, respectivamente (Fig. 11 D).

Por otro lado, sobre la línea MDA-MB-231, el tratamiento con ICRP indujo un  $14 \pm 1.0$ ,  $40.73 \pm 12.25$  y  $47.45 \pm 10.68\%$  de células con pérdida del marcaje con TMRE (CC1, 20 y 50, respectivamente). De esta forma, se indujo un  $21.2 \pm 3.81$ ,  $29.35 \pm 5.32$  y  $57.4 \pm 5.63\%$  de células con bajo marcaje de TMRE al ser tratadas con la CC1, 20 y 50 de CYP. Al realizar las combinaciones 1+50, 50+1, 20+20 y 50+50, la cantidad de células con pérdida del marcaje se vio aumentada, al obtener un  $88.88 \pm 7.83$ ,  $81.38 \pm 7.85$ ,  $56.26 \pm 23.19$  y  $95.72 \pm 2.84\%$ , respectivamente (Fig. 11 E).

Sobre la línea 4T1, los resultados mostraron un  $14.55 \pm 2.62$ ,  $19.33 \pm 3.48$  y  $56.14 \pm 8.15\%$  de células con pérdida de potencial de membrana mitocondrial inducida por el tratamiento con la CC1, 20 y 50 de ICRP, respectivamente. Estas mismas concentraciones del tratamiento con CYP evidenciaron  $8.33 \pm 2.67\%$  (CC1),  $21.6 \pm 5.34\%$  (CC20) y  $47.72 \pm 8.29\%$  (CC50) de células con pérdida de potencial de membrana mitocondrial, que al realizar las combinaciones, se incrementó hasta un  $95.22 \pm 2.28\%$  (1+50),  $94.63 \pm 3.03\%$  (50+1),  $93.6 \pm 1.61\%$  (20+20) y  $95.27 \pm 2.57\%$  (50+50) de células con marcaje perdido (Fig. 11 F).



**Figura 11. El ICRP en combinación con CYP induce pérdida de potencial de membrana mitocondrial.** Histogramas obtenidos mediante citometría de flujo después del marcaje con TMRE, en células MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) y 4T1 (C) tratadas con la CC1, 20 y 50 de ICRP, CYP y la combinación de ambos tratamientos durante 24 h. Las gráficas representan el promedio de al menos tres experimentos independientes, analizados por triplicado  $\pm$ DE en MCF-7 (D), MDA-MB-231 (E) y 4T1 (F).

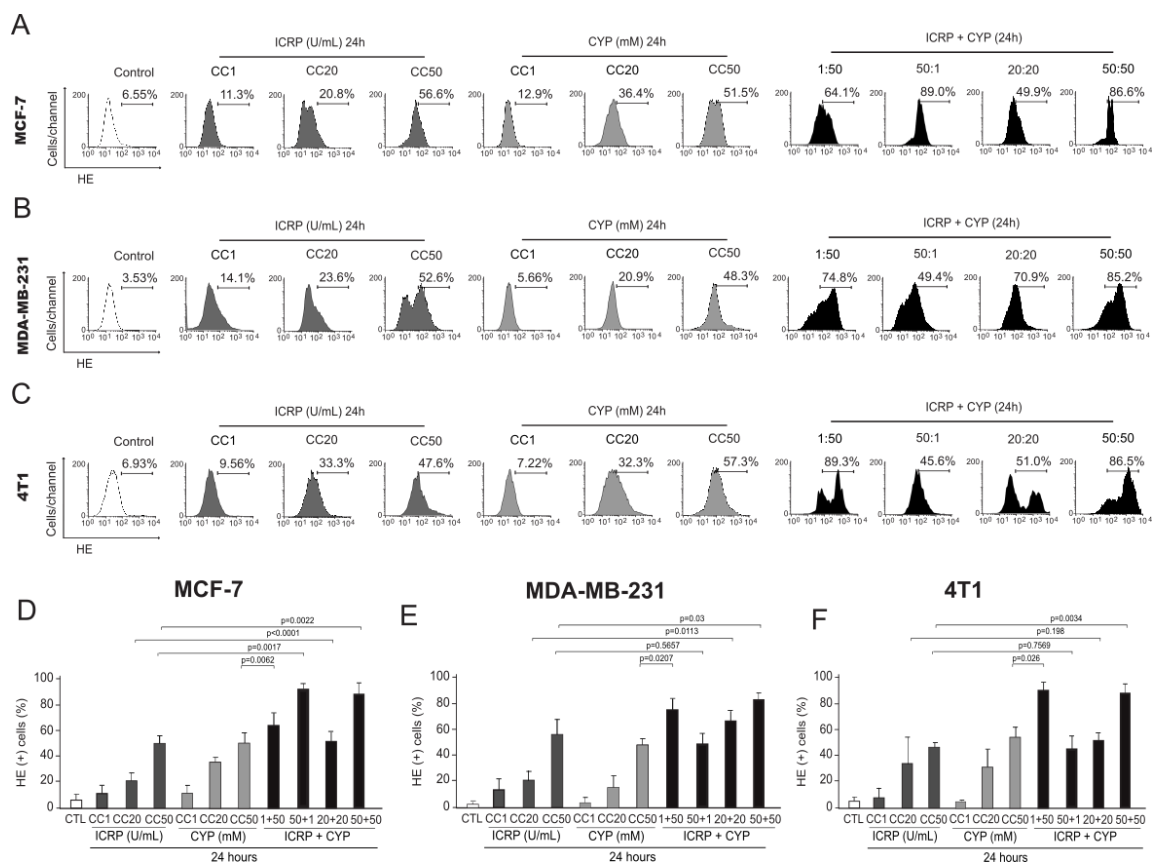
## 7.5 La combinación del ICRP con CYP induce estrés oxidativo en MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1

Como consecuencia de la respiración y la actividad enzimática, las células pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS). La producción de ROS excedente a la capacidad celular para detoxificar y/o utilizar las ROS resulta en estados no homeostáticos referidos como “estrés oxidativo”. Las ROS pueden causar la modificación progresiva o degradación de componentes bioquímicos celulares incluyendo el ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos, cuando son producidas a concentraciones fisiológicas elevadas (Ryter et al. 2007). Para evaluar si el ICRP en conjunto con CYP es capaz de generar ROS en respuesta al tratamiento en el contexto de la muerte celular, se empleó un marcaje con HE y se determinó que tanto el tratamiento con ICRP (CC1, 20 y 50) como con CYP (mismas concentraciones) y sus combinaciones a los ratios no constantes (1+50 y 50+1) y constantes (20+20 y 50+50) inducen la producción de ROS sobre MCF-7 (Fig. 12 A),

MDA-MB-231 (Fig. 12 B) y 4T1 (Fig. 12 C), evidenciado por un aumento en la fluorescencia positiva para el marcaje.

De los resultados sobre la línea MCF-7, se obtuvo marcaje positivo en un  $11.8 \pm 5.58$ ,  $21.38 \pm 6.62$  y  $50.58 \pm 5.84\%$  de células tratadas con ICRP, respectivamente, y de  $11.58 \pm 6.99$ ,  $35.86 \pm 3.84$  y  $50.33 \pm 7.41\%$ , respectivamente, de células tratadas con CYP en las CC1, 20 y 50 de ambos tratamientos. Al realizar los tratamientos con las combinaciones, las células positivas para este marcaje aumentaron hasta  $64.4 \pm 8.69\%$  (combinación 1+50),  $92.83 \pm 2.76\%$  (combinación 50+1),  $51.92 \pm 7.70\%$  (combinación 20+20), y  $88.58 \pm 8.45\%$  (combinación 50+50) (Fig. 12 D).

Además, se obtuvo un  $14.96 \pm 8.18$ ,  $22.12 \pm 7.46$  y  $56.52 \pm 11\%$  de células MDA-MB-231 positivas para HE al ser tratadas con la CC1, 20 y 50 de ICRP. Por otro lado, el tratamiento con la CC1, 20 y 50 de CYP, mostró un  $4.73 \pm 3.37$ ,  $16.43 \pm 9.42$  y  $48.5 \pm 5.25\%$  de células positivas para HE, respectivamente. Al combinar estos tratamientos, la cantidad de células positivas para HE, se incrementó a  $75.94 \pm 8.33\%$  con la combinación 1+50,  $49.7 \pm 7.49\%$  con 50+1,  $67.46 \pm 7.26\%$  con 20+20 y  $83.4 \pm 4.66\%$  con la combinación 50+50 (Fig. 12 E). Finalmente, al tratar las células 4T1 con la CC1, 20 y 50 de los tratamientos individuales, se indujo un  $8.13 \pm 6.67$ ,  $34.53 \pm 19.87$  y  $46.72 \pm 3.87\%$  por el ICRP, respectivamente, y  $4.93 \pm 1.51$ ,  $31.63 \pm 14.45$  y  $54.35 \pm 7.92\%$  por la CYP, respectivamente. Al realizar las combinaciones, se vio un porcentaje de  $90.46 \pm 5.33$ ,  $45.6 \pm 9.73$ ,  $52.04 \pm 5.46$  y  $88.41 \pm 6.91\%$  inducida por los tratamientos combinados en los radios 1+50, 50+1, 20+20 y 50+50, respectivamente (Fig. 12 F).



**Figura 12. El ICRP en combinación con CYP induce estrés oxidativo.** Histogramas obtenidos mediante citometría de flujo de las células MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) y 4T1 (C) que fueron tratadas con la CC1, 20 y 50 de ICRP, CYP y la combinación en ratios constantes y no constantes de ambos tratamientos durante 24 h, posteriormente marcadas con HE para el análisis de formación de ROS. Gráficas del promedio de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado  $\pm$ DE sobre MCF-7 (D), MDA-MB-231 (E) y 4T1 (F).

Bajo este panorama de resultados y tomando en cuenta que las combinaciones que tuvieron mayor efecto citotóxico en las 3 líneas celulares fueron las 1+50 y 50+50, se optó por elegir estas combinaciones para ahondar en las características bioquímicas y morfológicas involucradas en el proceso de muerte celular inducido por la combinación de ICRP+CYP.

## 7.6 El tratamiento del ICRP en combinación con CYP induce activación de caspasas en células MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1.

Las caspasas son una familia conservada de cisteín proteasas que juegan un papel central en muerte celular. Para evaluar si el tratamiento con ICRP en conjunto con CYP

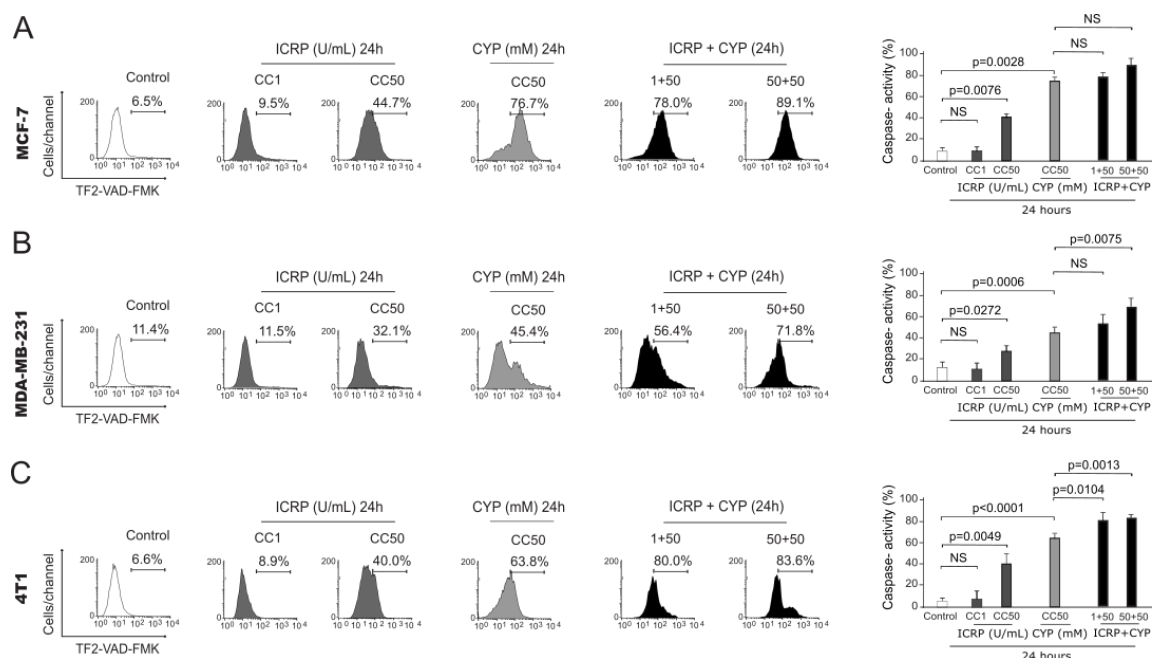
induce la activación de las caspasas en el contexto de muerte celular, se empleó un marcaje con TF2-VAD-FMK.

En el análisis se encontró que el ICRP (CC50) y la CYP (CC50), así como sus combinaciones en radios no constante y constante (1+50 y 50+50), inducen la activación de caspasas como se muestra en la figura 13. En el panel izquierdo se observan los histogramas obtenidos por citometría de flujo con un aumento de la fluorescencia positiva para TF2-VAD-FMK cuando se aplican los tratamientos a las células MCF-7 (Fig. 13 A), MDA-MB-231 (Fig. 13 B) y 4T1 (Fig. 13 C), comparadas con el control, el cual no presenta marcaje al no tener caspasas activas.

La gráfica en el panel derecho muestra que al combinar la CC1 de ICRP (que mostró marcaje positivo para TF2-VAD-FMK en  $10.36 \pm 3.65\%$ ), con la CC50 de CYP durante 24 h se indujo en MCF-7 un aumento del marcaje positivo no significativo ( $78.88 \pm 4.48\%$ ) comparada con el tratamiento individual de la CYP ( $75.4 \pm 3.67\%$ ). De esta misma forma, al combinar la CC50 de ICRP (la cual indujo un  $42.03 \pm 3\%$  de células con marcaje positivo) con la CC50 de CYP, se mostró un  $89.75 \pm 5.6\%$  de células con marcaje positivo para TF2-VAD-FMK, siendo significativamente mayor al tratamiento con el ICRP independiente ( $p=0.004$ ), pero no al de la CYP (Fig. 13 A).

Por otro lado, sobre la línea MDA-MB-231, el tratamiento con ICRP de manera independiente, indujo un  $11.8 \pm 5.84$  y  $28.14 \pm 4.63\%$  de células con marcaje con TF2-VAD-FMK (CC1 y 50 respectivamente). De esta forma, se indujo un  $45.64 \pm 5.21\%$  de células con marcaje positivo al ser tratadas con la CC50 de CYP; marcaje que al realizar las combinaciones se vio aumentado, al obtener un  $53.86 \pm 8.21$  y  $69.5 \pm 9.1\%$  con la combinación 1+50 y 50+50, respectivamente, siendo significativo sólo para la combinación 50+50 con respecto a los tratamientos individuales (Fig. 13 B).

Además, sobre la línea 4T1, los resultados mostraron un  $8.08 \pm 6.63$  y  $40.92 \pm 9.22\%$  de células con marcaje positivo para TF2-VAD-FMK, inducido por el tratamiento con la CC1 y 50 de ICRP, respectivamente. Por otro lado, el tratamiento con CYP (CC50) evidenció  $64.9 \pm 4.01\%$  de activación, que al realizar las combinaciones, se incrementó significativamente hasta  $81.3 \pm 6.81\%$  (1+50) y  $83.22 \pm 3.39\%$  (50+50) (Fig. 13 C).



**Figura 13. El ICRP en combinación con CYP induce la activación de caspasas.** Histogramas obtenidos mediante citometría de flujo después del marcaje con TF2-VAD-FMK de células MCF-7 (**A**), MDA-MB-231 (**B**) y 4T1 (**C**) tratadas con la CC1 y 50 de ICRP, CC50 de CYP y la combinación de los tratamientos durante 24 h. Las gráficas (derecha) representan el promedio de al menos tres experimentos independientes, analizados por triplicado  $\pm$ DE.

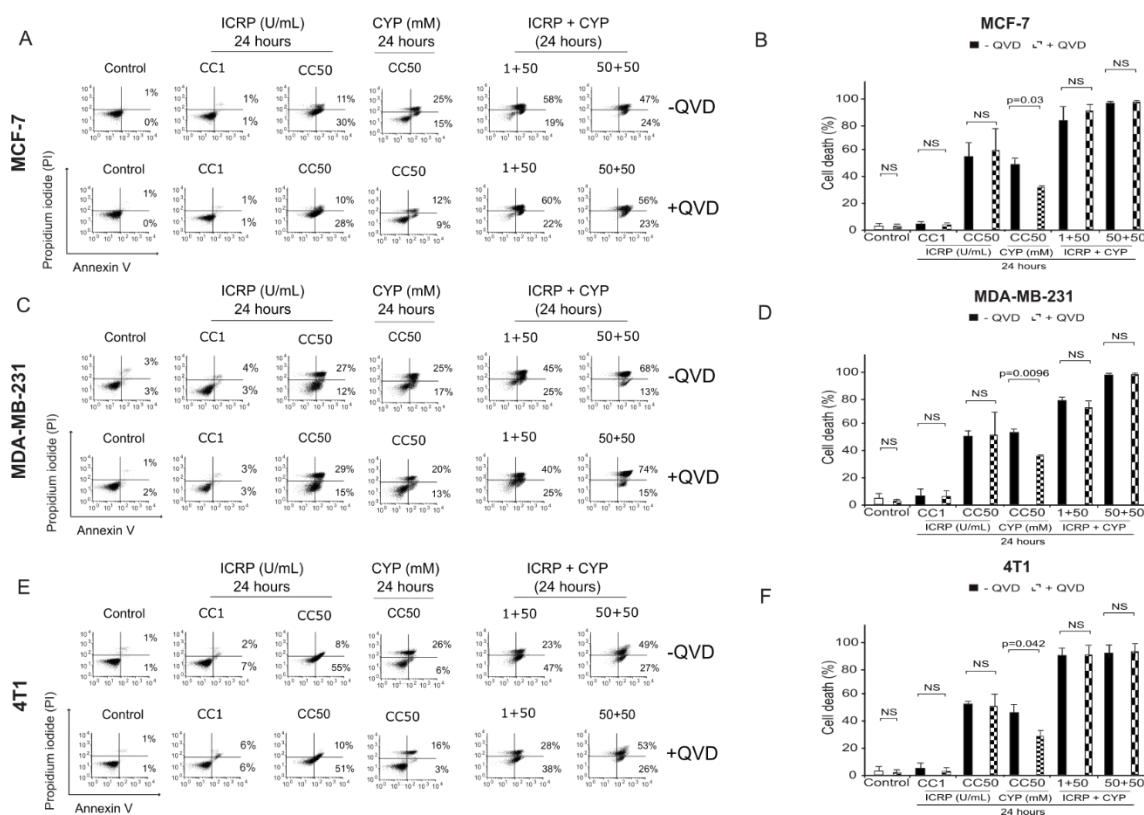
## 7.7 El tratamiento con la combinación de ICRP con CYP induce muerte celular independiente de caspasas y dependiente de ROS

Debido a que los resultados anteriores evidenciaron la activación de caspasas y producción de ROS inducida por los tratamientos independientes y por las combinaciones, se evaluó si estos mediadores son indispensables para la muerte celular.

Para evaluar la implicación de las caspasas en la muerte celular inducida por las combinaciones, las células fueron pretratadas con QVD, un químico que ha demostrado ser capaz de inhibir la actividad de las caspasas sin ser tóxico para las células (Caserta et al. 2003) y se analizó la muerte celular después de ser tratadas con el ICRP, la CYP y las combinaciones durante 24 horas.

En ausencia del inhibidor de caspasas, los resultados muestran el desplazamiento de la población hacia los cuadrantes indicativos de muerte celular (marcaje positivo para annexina V y yoduro de propidio) tanto en el tratamiento con ICRP (CC1 y 50), como para el tratamiento con CYP (CC50) y para las combinaciones 1+50 y 50+50, además, se

muestra que el inhibidor de caspasas no disminuye la población en los cuadrantes de muerte celular inducida por el ICRP (CC1 y 50) ni por las combinaciones 1+50 y 50+50, contrario a lo observado con la CYP (CC50) en las líneas celulares probadas (Fig. 14 A, C y E). Los resultados evidencian que la muerte celular inducida por la CYP se disminuye significativamente al inhibir las caspasas, sin embargo, la muerte celular inducida por el ICRP y por las combinaciones no disminuye significativamente al utilizar el inhibidor en las líneas MCF-7 (Fig. 14 B), MDA-MB-231 (Fig. 14 D) y 4T1 (Fig. 14 F), indicando que aunque exista activación de caspasas inducida por los tratamientos, la muerte celular que estos inducen es independiente de caspasas.

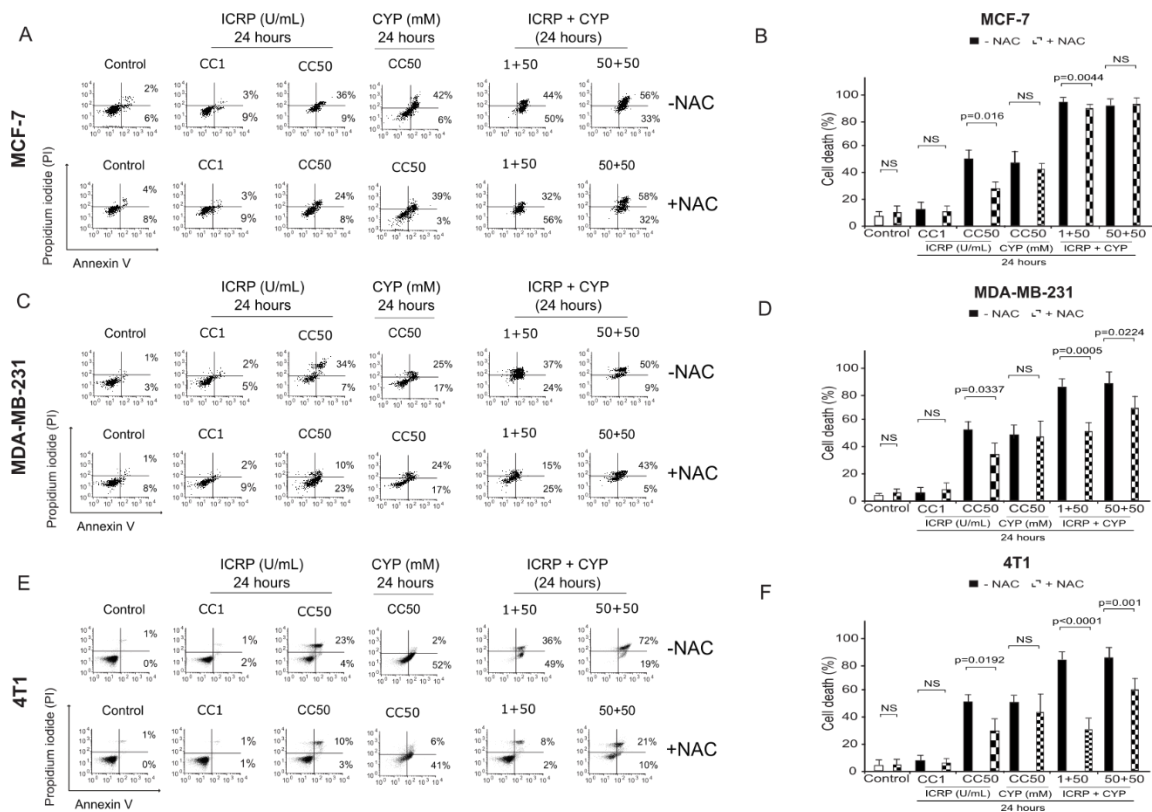


**Figura 14. La muerte celular inducida por el tratamiento con ICRP y CYP es independiente de caspasas.** Las células tratadas con la CC1 y 50 de ICRP, CC50 de CYP y sus combinaciones en ausencia (negro) o presencia (cuadros blancos y negros) de QVD durante 24 h, posteriormente marcadas con AnnV/PI para el análisis de muerte celular. Dot plots obtenidos mediante citometría de flujo y gráficas del promedio de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado  $\pm$ DE en las células MCF-7 (A y B), MDA-MB-231 (C y D) y 4T1 (E y F).

Para conocer si la muerte celular inducida por los tratamientos es dependiente de ROS, las células fueron pretratadas con la N-acetilcisteína, (NAC), un antioxidante y precursor



del glutatión, dejando las células solas o pre-tratadas con el NAC, se aplicaron los tratamientos con la CC1 y 50 de ICRP, la CC50 de CYP y las combinaciones 1+50 y 50+50, y se evaluó la muerte celular después de 24 h. Los resultados mostraron que la inhibición de las ROS, disminuye significativamente la muerte celular inducida por el ICRP a la CC50 sobre las tres líneas tumorales; este efecto no se observa en ningún caso por el tratamiento con la CC50 de CYP (Fig. 15). Por otro lado, al aplicar la combinación 1+50, se muestra que al utilizar el NAC, la muerte celular inducida sobre MCF-7 (Fig. 15 A y B), MDA-MB-231 (Fig. 15 C y D) y 4T1 (Fig. 15 E y F), se ve reducida; sin embargo, al analizar la combinación 50+50, se determinó que al inhibir las ROS, la muerte celular se ve disminuida significativamente únicamente sobre las líneas MDA-MB-231 y 4T1 (Fig. 15 C, D, E y F).



**Figura 15. La muerte celular inducida por el tratamiento con ICRP y CYP es dependiente de ROS.** Las células tratadas con la CC1 y 50 de ICRP, CC50 de CYP y sus combinaciones en ausencia (negro) o presencia (cuadros blancos y negros) de NAC durante 24 h, posteriormente marcadas con AnnV/PI para el análisis de muerte celular. Dot plots obtenidos mediante citometría de flujo y gráficas del promedio de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado  $\pm$ DE en las células MCF-7 (A y B), MDA-MB-231 (C y D) y 4T1 (E y F).

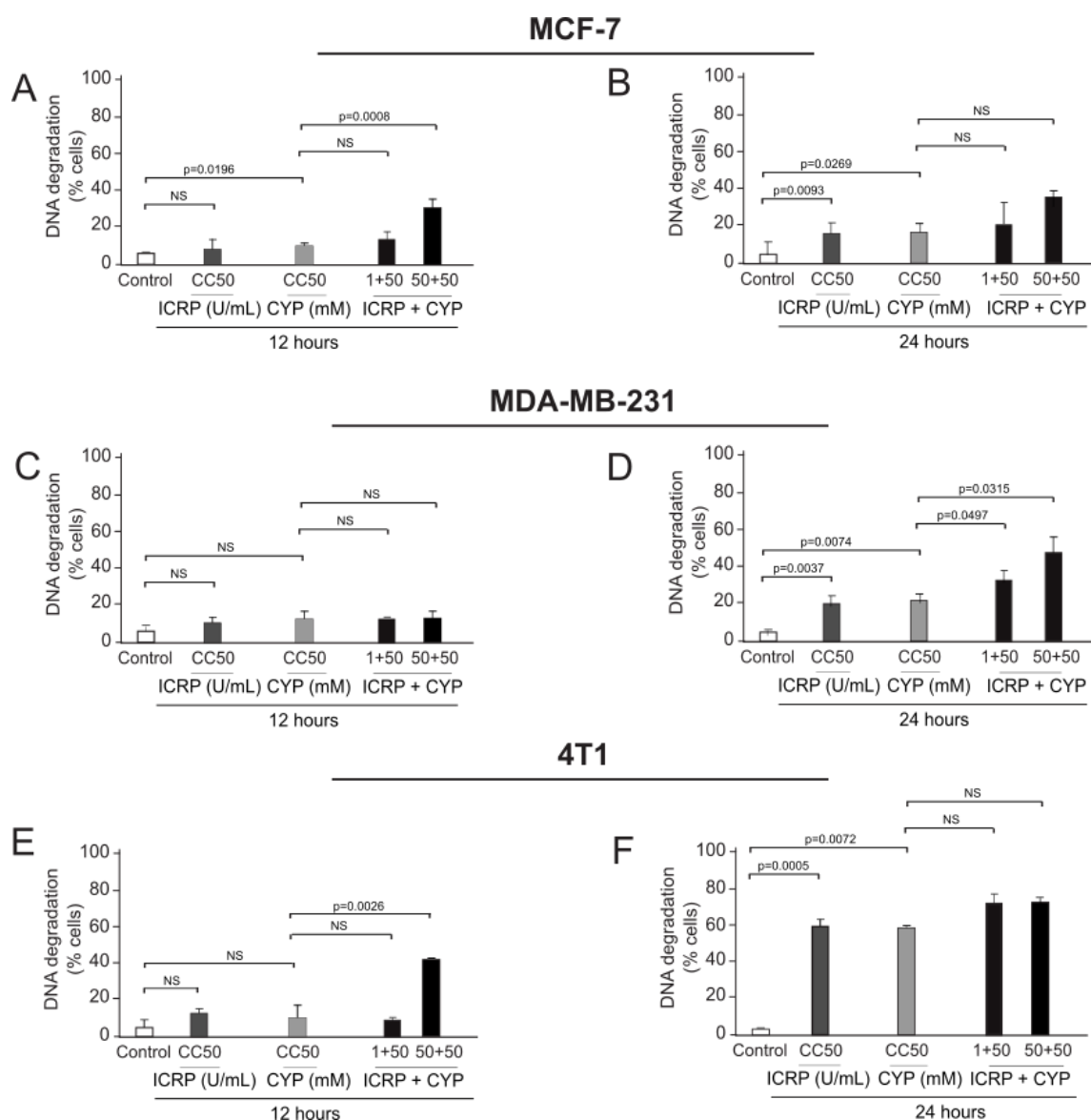
### **7.8 El tratamiento con la combinación del ICRP con CYP induce la degradación del ADN a las 12 y 24 horas en MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1.**

La actividad catalítica de las caspasas ejecutoras promueve la eliminación celular y es responsable de algunos de los cambios morfológicos y bioquímicos relacionados a la apoptosis, incluyendo la fragmentación del ADN (Galluzzi et al. 2018). Para evaluar si el ICRP en conjunto con CYP es capaz de inducir la degradación del ADN en respuesta al tratamiento, se empleó un marcaje con PI para analizar la población subG1.

Los resultados muestran que a las 12 h de tratamiento, la combinación 1+50 no induce degradación del ADN significativa con respecto al tratamiento individual, mientras que la combinación 50+50 induce significativamente un aumento en la degradación del ADN en MCF-7, comparada con los tratamientos individuales (Fig. 16 A). Al cabo de 24 h de tratamiento con ICRP y CYP de manera independiente, se induce de manera significativa la degradación del ADN, lo cual no es significativo en la combinación 1+50 comparada con el tratamiento individual, y en la 50+50 únicamente es significativa comparada contra el ICRP ( $p=0.0415$ ), pero no contra la CYP (Fig. 16 B).

Además, se determinó que a las 12 h, los tratamientos no inducen la degradación del ADN significativamente en MDA-MB-231 (Fig. 16 C), sin embargo, a las 24 horas de tratamiento (CC50 de ICRP, CC50 de CYP, y combinaciones 1+50 y 50+50) se indujo la degradación de ADN de manera significativa (Fig. 16 D).

Por otro lado, en la línea 4T1, únicamente la combinación 50+50, indujo significativamente degradación de ADN a las 12 h comparada contra los tratamientos individuales (Fig. 16 E). Mientras que a las 24 h, el tratamiento con el ICRP y la CYP de manera independiente, inducen significativamente la degradación del ADN, así como las combinaciones. Sin embargo, en el caso de la combinación 1+50, la degradación del ADN no es significativamente mayor a la inducida por el tratamiento con CYP. Y, finalmente la degradación de ADN inducida por la combinación 50+50 es significativamente mayor al tratamiento con ICRP ( $p=0.0289$ ) pero no al de la CYP (Fig. 16 F).

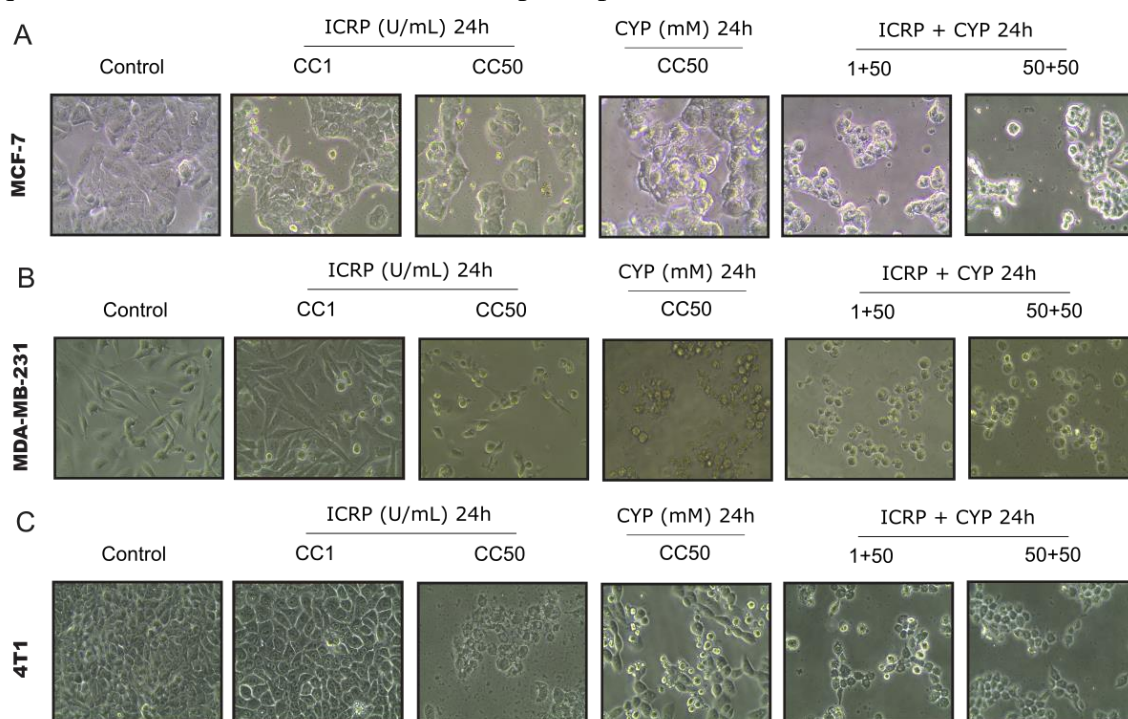


**Figura 16. El tratamiento con ICRP en combinación con CYP induce degradación del ADN a las 12 y 24 h.** Células con ADN degradado al ser tratadas con la CC50 de ICRP y CYP y la combinación de ambos tratamientos durante 12 y 24 h sobre las líneas MCF-7 (**A y B**), MDA-MB-231 (**C y D**) y 4T1 (**E y F**) obtenido a partir del marcaje con yoduro de propidio, analizando la población subG1. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado  $\pm$ DE

### 7.9 El tratamiento con la combinación del ICRP con CYP induce cambios morfológicos en células de cáncer de mama

Para analizar los cambios morfológicos inducidos por los tratamientos y relacionarlos con la citotoxicidad, se analizaron las células mediante microscopía de luz luego de 24 h en presencia de los tratamientos de manera independiente y sus combinaciones.

La figura 17 revela que no existen notables cambios en la morfología de las células MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) y 4T1 (C) al ser tratadas con la CC1 de ICRP correspondiente. Además se observa una disminución de la confluencia en las tres líneas tumorales, luego de ser tratadas con la CC50 de ICRP y CYP. Al realizar las combinaciones 1+50 y 50+50, se aprecian células desadheridas y abundantes restos celulares. No obstante, se puede indicar que la morfología de la muerte celular se conserva muy similar a la inducida por la CYP de manera independiente, lo que indica que aunque los mecanismos citotóxicos se sumen y sean diferentes, las características morfológicas que se involucran la muerte celular se superan por la ciclofosfamida.



**Figura 17. El tratamiento con ICRP en combinación con CYP induce cambios morfológicos.** Micrografías de campo claro (20X) de células MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) y 4T1 (C) tratadas con CC1 y 50 de ICRP, CC50 de CYP y la combinación de ambos tratamientos durante 24 h.

#### 7.10 La combinación del ICRP con CYP induce exposición/ liberación de DAMPs

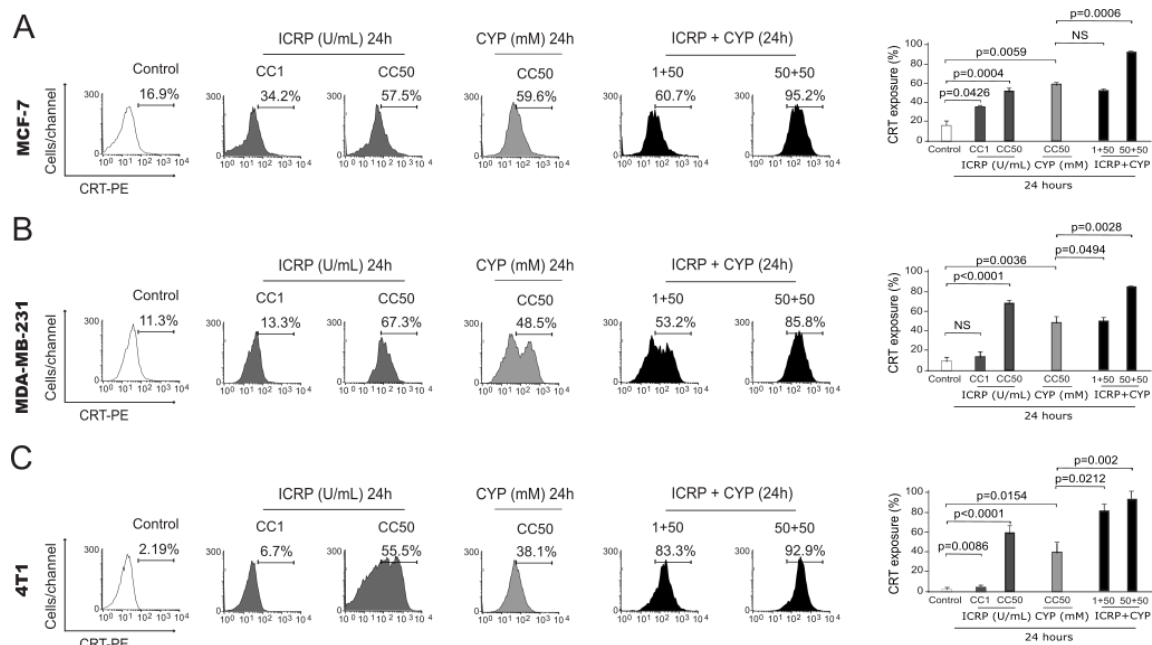
La muerte celular regulada, no solo refleja una función homeostática de eliminación de células potencialmente peligrosas, sino también la capacidad de las células moribundas para exponer o liberar moléculas que alerten al organismo de una amenaza potencial; tales señales de daño son comúnmente referidas como Patrones Moleculares Asociados a Daño

(DAMPs). Debido a que se ha reportado que tanto el ICRP como la CYP son capaces de inducir la exposición/liberación de DAMPs, se estudió si en combinación se mantenía o potenciaba la misma. Para ello se marcaron las células con un anticuerpo anti calreticulina acoplado a ficoeritrina (CRT-PE), para analizar la exposición de calreticulina (el principal DAMP relacionado a muerte celular inmunogénica).

En la Figura 18 (A, B y C) se muestra que las células MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 al ser tratadas con la CC1 y 50 del ICRP, así como la CC50 de CYP presentan marcaje positivo para la CRT, y que al combinar los tratamientos a la 1+50 se induce un incremento de la positividad para el marcaje, sin embargo, en la combinación 50+50 se observa un aumento mayor del marcaje con respecto a los tratamientos individuales; obteniendo que sobre las células MCF-7 (Fig. 18 A), el tratamiento con CC1 y 50 de ICRP induce  $35.9 \pm 1$  y  $52.37 \pm 2.62\%$  de exposición de calreticulina, al tiempo que la CYP induce  $59.3 \pm 2.12\%$  y que al combinar los tratamientos se observó  $52.53 \pm 1.89$  y  $92.4 \pm 0.14\%$  con la 1+50 y 50+50, respectivamente.

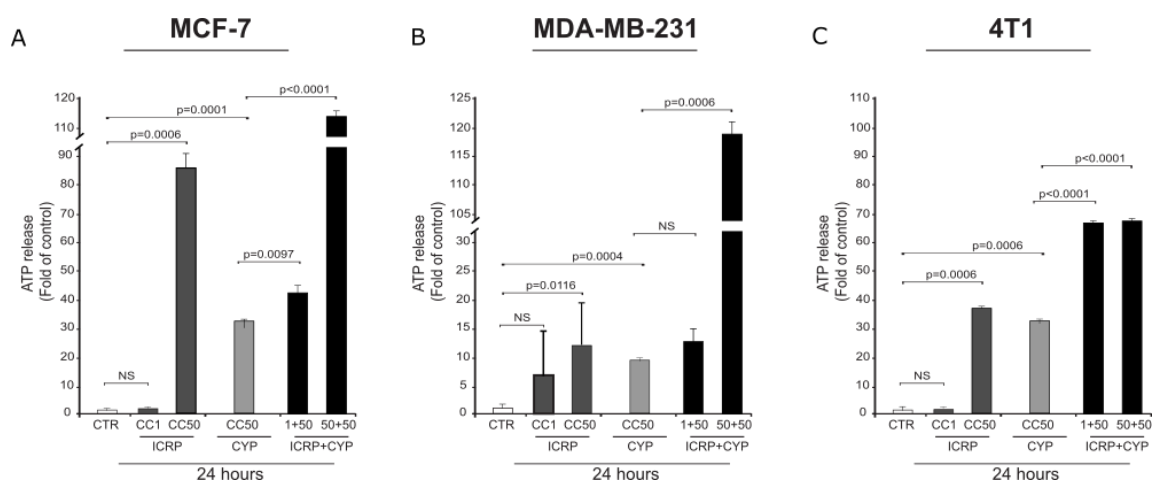
Además, se obtuvo un porcentaje de células MDA-MB-231 positivas para CRT-PE en  $14.4 \pm 3.95$  y  $68.7 \pm 1.8\%$  al ser tratadas con la CC1 y 50 de ICRP. La CC50 de tratamiento con CYP, mostró un  $49 \pm 5\%$  de células positivas para CRT; al combinar estos tratamientos, la cantidad de células positivas se incrementó significativamente a  $50.55 \pm 4.17\%$  con la combinación 1+50, y  $85.6 \pm 0.28\%$  con la combinación 50+50 comparadas con los tratamientos independientes (Fig. 18 B).

Finalmente, al tratar las células 4T1 con los tratamientos individuales, se indujo un  $4.6 \pm 0.91$  y  $59.62 \pm 6.4\%$  de células positivas para CRT por la CC1 y 50 de ICRP, respectivamente, y  $40 \pm 9.1\%$  por la CC50 de CYP. Los tratamientos combinados en los radios 1+50 y 50+50, indujeron un  $81.64 \pm 5.98$  y  $93.12 \pm 9.15\%$  de células positivas, respectivamente, los cuales fueron significativamente mayores a los tratamientos individuales (Fig. 18 C).



**Figura 18. El ICRP en combinación con CYP induce la exposición de calreticulina.** Histogramas obtenidos mediante citometría de flujo después del marcaje con CRT-PE en células MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) y 4T1 (C) tratadas con la CC1 y 50 de ICRP, CC50 de CYP y la combinación de los tratamientos durante 24 h. Las gráficas (derecha) representan el promedio de al menos tres experimentos independientes, analizados por triplicado  $\pm$ DE.

Otro DAMP importante es la liberación de ATP por las células en proceso de muerte (Garg et al. 2015). En ese sentido, se evaluó si las combinaciones de ICRP con CYP podían inducir la presencia de ATP en el sobrenadante de células tratadas. El tratamiento con la CC1 de ICRP no logró inducir la liberación de ATP sobre las líneas MCF-7 (Fig. 19 A), MDA-MB-231 (Fig. 19 B) y 4T1 (Fig. 19 C). Sin embargo, las células tratadas con la CC50 de ICRP y de CYP mostraron la liberación de ATP significativa. Al combinar los tratamientos se evidenció una liberación de ATP, la cual fue significativamente mayor a los tratamientos independientes en la combinación 1+50 sobre MCF-7 (Fig. 19 A) y 4T1 (Fig. 19 C), y en la combinación 50+50 sobre las tres líneas celulares evaluadas (Fig. 19).



**Figura 19. El ICRP en combinación con CYP induce la liberación de ATP.** Las células MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) y 4T1 (C) tratadas con la CC1 y 50 de ICRP, CC50 de CYP y la combinación de los tratamientos durante 24 h, el sobrenadante de cada muestra se tomó para medir la liberación de ATP, detectado mediante bioluminiscencia. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes, analizados por duplicado  $\pm$ DE.

## 8. DISCUSIÓN

La terapia combinada se conceptualizó por primera vez en 1965, cuando Emil Frei, James F. Holland y Emil J. Freireich postularon la posibilidad de la primera quimioterapia combinada para la leucemia linfocítica aguda (LLA). Los pacientes pediátricos con LLA fueron tratados con combinaciones de metotrexato, 6-mercaptopurina, vincristina y prednisona, y se demostró que las combinaciones tuvieron éxito en la reducción de la carga tumoral y en la prolongación de la remisión (Frei et al. 1965). Como consecuencia del éxito de este régimen, la investigación en la terapia contra el cáncer se centró en investigar las terapias combinadas con agentes que se dirigen a diferentes vías para crear un efecto sinérgico o aditivo (Mokhtari et al. 2017). Estudios actuales han revelado que aparte de la citotoxicidad de las quimioterapias, estos agentes también pueden provocar efectos inmunopotenciadores al liberar antígenos tumorales, facilitando su interacción con inmunoterapias, por lo que la integración de estos métodos potencialmente complementarios representa una efectiva estrategia contra el cáncer (Luo et al. 2019). En este contexto, nuestro grupo de investigación previamente demostró que la combinación de ICRP con ciclofosfamida inhibe la viabilidad celular de líneas de cáncer de mama en una manera sinérgica y aditiva. Por lo tanto, en esta tesis se exploró el mecanismo de muerte celular inducido por esta combinación en células de cáncer de mama de ratón, 4T1 (triple negativo), y humanas, MCF-7 (luminal A) y MDA-MB-231 (triple negativo).

En resumen esta tesis describe las características bioquímicas y morfológicas de la muerte celular inducida por el tratamiento con ICRP, por la CYP y por sus combinaciones en radios constantes y no constantes de los tratamientos. En esta sección discutiré los aspectos principales involucrados en muerte celular regulada:

1. Potencial citotóxico del ICRP, CYP y la combinación ICRP+CYP.
2. Alteraciones mitocondriales inducidas en el proceso de muerte.
3. Mediadores bioquímicos de la muerte celular.
4. Efectores de la muerte celular inducida por los tratamientos.
5. Alteraciones nucleares y morfológicas.
6. Capacidad molecular de muerte celular inmunogénica.

Y dentro de cada aspecto se discutirá la relevancia y el alcance de los resultados obtenidos.



### **8.1 Potencial citotóxico del ICRP, CYP y la combinación ICRP+CYP**

Antes de ahondar en el mecanismo de muerte inducida por la combinación de ICRP+CYP en las células de cáncer de mama, se decidió evaluar el efecto tanto del ICRP como de la CYP de manera independiente sobre la viabilidad celular.

Previamente se ha estudiado el efecto del ICRP sobre líneas de cáncer de mama, principalmente sobre MCF-7 (Franco Molina et al. 2006; Mendoza Gamboa et al. 2008; Martínez Loria 2017; Álvarez Valdéz 2018; Guzmán Aguillón 2018), así como sobre MDA-MB-231 (Guzmán Aguillón 2018). En todos los casos se determinó que el tratamiento con ICRP disminuye la viabilidad celular en una manera dependiente de la concentración. Además se relacionó esta disminución de la viabilidad con un aumento en la muerte celular. Como se reportó anteriormente, en este estudio se encontró que el ICRP disminuye la viabilidad de las líneas MCF-7, MDA-MB-231 Y 4T1 e induce muerte celular en una manera dependiente de la concentración, ya que conforme aumenta la concentración de ICRP, la viabilidad celular se disminuye en una mayor proporción y la muerte celular aumenta con el tratamiento. Además se observó que las células murinas, 4T1 resultaron más sensibles al tratamiento con ICRP, comparadas con su contraparte humana MCF-7 y MDA-MB-231.

Esto podría deberse a diferencias en las características bioquímicas relacionadas con el mecanismo de muerte celular inducido por el ICRP en esta línea celular, las cuales se discutirán en apartados siguientes.

Además, el tratamiento con CYP indujo disminución de la viabilidad y muerte celular en una manera dependiente de la concentración sobre MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1. Anteriormente se probó también la capacidad de la CYP de inhibir la viabilidad y de inducir la muerte de MCF-7 y MDA-MB-231 por Guzmán Aguillón en el 2018, en donde congruente con los resultados demostrados por esta tesis, las líneas MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1 disminuyeron la viabilidad celular conforme se incrementaron las concentraciones de CYP al tiempo que se indujo muerte celular. Aunque la sensibilidad a la quimioterapia se comportó de manera similar en las tres líneas de cáncer probadas, sin embargo, contrario a los resultados determinados por Guzmán Aguillón, en este estudio las líneas TNBC resultaron más sensibles a la CYP comparadas con las MCF-7, ya que se pudo determinar la CC50 del tratamiento con CYP sobre MCF-7 en 30mM, mientras que

sobre MDA-MB-231 y 4T1 se determinó en 27 y 24 mM, respectivamente. Esta diferencia en la sensibilidad al tratamiento con quimioterapia se ha estudiado previamente y se ha determinado que los subtipos TNBC se asocian con grados más altos de respuesta patológica completa (CR) de aproximadamente 45%, mientras que los tumores luminales tienen una CR de 6% (determinados mediante perfil de expresión de genes asociados con CR) a la quimioterapia (Rouzier et al. 2005).

Se han reportado combinaciones de la ciclofosfamida con agentes como el resveratrol (Singh et al. 2009), Interferón de tipo I (Schiavoni et al. 2010) y el organoselenium (Chakraborty et al. 2016) contra células tumorales, encontrando mejores efectos que el uso del agente individual. Sin embargo, resultados previos de nuestro equipo de investigación muestran en un panel amplio de combinaciones de ICRP+CYP sobre MCF-7 y MDA-MB-231 efectos aditivos y sinérgicos dependiendo del radio utilizado, resultando mejor las combinaciones en concentraciones no constantes a un radio que implicó bajas concentraciones de ciclofosfamida y altas de ICRP (Guzmán Aguillón 2018). Por otro lado, en esta investigación se determinó el efecto de combinaciones de ICRP+CYP en radios no constantes (1+50 y 50+1) y constantes (20+20 y 50+50), y diferente a lo que se reportó previamente, se encontró que sobre la línea MCF-7 la combinación de ICRP+CYP incrementó de manera potenciada la muerte celular independientemente de los radios utilizados. Sin embargo, sobre la línea MDA-MB-231 los resultados de las combinaciones fueron similares a los reportados ya que en ambos estudios concentraciones mínimas de ICRP (CC1) incrementan el efecto antitumoral de la CYP (CC50) y, en ambas investigaciones se demuestra en la combinación 50+1 que la CYP (CC1) no incrementa significativamente la muerte celular inducida por el ICRP (CC50). Paralelamente, la combinación 20+20 mostró efecto citotóxico potenciado que se demostró en ambos estudios.

Además, en este trabajo se muestra por primera vez, el efecto citotóxico de la combinación de ICRP+CYP sobre la línea murina 4T1, sobre la cual la combinación 50+1 no muestra tener una muerte celular significativamente mayor a la inducida por el tratamiento individual (CC50 ICRP) y las combinaciones 1+50, 20+20 y 50+50 ejercen muerte celular potenciada; similar a lo observado en su contraparte humana (MDA-MB-231). Las diferencias en el efecto de las combinaciones sobre las líneas TNBC y MCF-7

podrían deberse a que las características involucradas en el proceso de muerte tengan diferente comportamiento en las mismas; las cuales se ahondarán en los siguientes apartados.

En respuesta a agentes terapéuticos contra el cáncer, que generalmente inducen un daño al ADN (como los agentes alquilantes) las células pueden entrar en un arresto del ciclo celular (para permitir la reparación de los daños) o morir (si los daños son irreparables). Los primeros análisis bioquímicos y moleculares en el mecanismo de muerte celular inducido por el ICRP evidenciaron que disminuye la expresión de mRNA de proteínas como p53 en MCF-7 (Franco Molina et al. 2006), y posteriormente se encontró que el mecanismo de muerte del ICRP incluye arresto en el ciclo celular desde las 16 h de tratamiento sobre HeLa (Martínez Torres et al. 2018) y a las 24 h de tratamiento en A549, A427 y MCF-7 (Martínez Torres et al. 2019; Martínez Loria 2017) que se preserva en todas las líneas celulares en la fase G2/M. Por otro lado, apoptosis dependiente de p53 inducida por el tratamiento con CYP sobre MCF-7 se ha reportado previamente también por otro estudio encontrando que la CYP induce arresto del ciclo celular a concentraciones bajas en fase G1, mientras que a altas concentraciones se observa arresto dependiente de dosis en fase G1, S y G2/M a 48 h de tratamiento (Singh et al. 2009).

En esta investigación se mostró que a las 12 h de tratamiento con ICRP (CC20 y 50), con CYP (CC20), así como las combinaciones (1+50, 50+1, 20+20 y 50+50) no inducen arresto del ciclo celular en la línea MCF-7, únicamente a la CC50 de CYP se observó arresto del ciclo celular en fase G2/M. A pesar de que el tratamiento con la CC50 de ICRP demostró arresto del ciclo celular en fase G2/M por Martínez Loria, el arresto fue evidente a las 24 horas de tratamiento; por lo que es lógico pensar que a las 12 h el efecto del ICRP (CC20 y 50) sea insuficiente para inducir arresto. De manera similar, es de suponer que la CC20 de CYP no induce un daño que la célula sea capaz de sensar y que conduzca a detener el ciclo celular, contrario a la CC50. Esto es similar a lo encontrado por Chen y colaboradores, donde demostraron que la activación intracelular de la CYP induce arresto del ciclo celular en fase G2/M en MCF-7 (Chen et al. 1996). Además, la citotoxicidad potenciada independiente de los radios empleados observada en MCF-7 a las 24 h de tratamiento hace pensar que estos efectos terapéuticos potenciados se obtuvieron sin

ningún aparente arresto del ciclo celular, como se observa a las 12 h, si no que directamente los tratamientos confieren la muerte celular. Sin embargo, sería necesario evaluar la muerte celular a las 12 h y el ciclo celular a las 24 h de tratamiento con estos agentes y sus combinaciones para corroborar este razonamiento.

Los resultados de esta investigación muestran, por primera vez, el efecto del ICRP, la CYP y las combinaciones de ICRP+CYP sobre el ciclo celular de MDA-MB-231 y 4T1. En la línea MDA-MB-231, la CC20 de ICRP y de CYP mostraron inducir arresto del ciclo celular en fase S y G2/M y en G2/M, respectivamente, a las 12 h de tratamiento; lo cual no se observó en ninguna fase del ciclo celular con la CC50 de ambos tratamientos independientes. Este arresto del ciclo celular en fase G2/M se conserva al realizar las combinaciones en los cuatro radios estudiados (1+50, 50+1, 20+20 y 50+50).

Los tratamientos independientes a la CC20 podrían estar induciendo un estrés celular y las combinaciones un daño al ADN que en respuesta a los mismos resulta en un arresto del ciclo celular en la fase G2/M y en la muerte celular. Sin embargo, el mecanismo es pobremente entendido dado que esta línea tiene p53 mutado. Choi y Yu en el 2012 demostraron que el paclitaxel indujo arresto en fase G2/M y apoptosis en MDA-MB-231 mediado por la regulación a la alza de p21 independiente de p53 (Choi y Yoo 2012). La progresión a G2/M está conducida por MPF, un complejo de ciclina B1/cdc2. Ambas se acumulan y asocian en el citoplasma durante G2. El complejo se mantiene inactivo por la fosforilación de cdc2 en Thr14 y Tyr15. La entrada a la mitosis está impulsada por la translocación del complejo al núcleo y la activación por desfosforilación por las fosfatasas de Cdc25. En ese sentido p53 está involucrado en el mantenimiento antes que en la iniciación del arresto en G2. Cdc25c, la fosfatasa que promueve la apoptosis es inhibida después del daño al ADN a través de la fosforilación en la Ser216 por Chk1 y Chk2, promoviendo su secuestro en el citoplasma y/o inhibición de su actividad fosfatasa. Por otro lado p21 también está implicada en el mantenimiento del arresto en G2 a través de su unión a PCNA (Giono y Manfredi 2006) que interfiere con su actividad en la reparación del ADN (Abbas y Dutta 2009). Un arresto en la fase de síntesis podría indicar que las células intentan reparar el daño causado frenando su crecimiento y a la vez inhibiendo la división celular. Esto despierta el interés en conocer la vía implicada particularmente en el arresto determinado sobre estas células.

Por otro lado, en la línea 4T1, la CC50 de ICRP indujo arresto en fase G1 y la CC50 de CYP en fase G2/M, mientras que las CC20 de ambos tratamientos independientes, al igual que en la combinación 50+1, no se observó arresto del ciclo celular. Además, al realizar las combinaciones, la 1+50 muestra arresto en fase G2, en fase G1 y G2 con la combinación 20+20 y arresto en fase G1 con la combinación 50+50.

Con estos resultados destacamos que la CC20 de los tratamientos individuales no es suficiente para inducir un daño al ADN que conduzca al arresto del ciclo celular. No obstante, al combinar estas concentraciones equipotentes, se evidenció arresto en G1 y G2 que parece indicar que al sumarse la citotoxicidad de ambos tratamientos, se induce un efecto similar a lo observado con la CC50 de manera independiente las cuales evidenciaron arresto en G1 con ICRP y G2/M con CYP: ya que estas concentraciones (CC50) sí inducen un daño al ADN. Se ha caracterizado que la línea 4T1 tiene niveles reducidos de CDK2ap1, p53, Cdkn1a y ciclina G (Ccng1), sin embargo, la expresión de Gadd45 es elevada; que en contexto, podría suponer que el arresto en fase G2/M por la CC50 CYP, la combinación 1+50 y 20+20 esté mediada por esta proteína. La progresión del ciclo celular está conducida por los eventos de fosforilación mediados por los complejos ciclina/cdk (ciclina D/cdk4, ciclina E/cdk2 y ciclina A/cdk2), los cuales secuencialmente fosforilan a pRb. Después de la activación por el daño al ADN, p53 induce la expresión de p21, que se unirá e inhibirá la actividad de los complejos ciclina/cdk y con ello la progresión del ciclo celular (Giono y Manfredi 2006). Sin embargo, hacen falta estudios para dilucidar las vías río arriba involucradas en los eventos que implican un arresto en el ciclo celular.

Se sabe que la CYP es una quimioterapia utilizada en un amplio espectro de neoplasias, sin embargo presenta toxicidad hematológica relacionada a las altas dosis terapéuticas (Kurauchi et al. 2017). Supresión de la médula ósea es efecto tóxico más común. La leucopenia, trombocitopenia y anemia son comunes después de la administración de altas dosis de CYP, sin embargo, generalmente ocurre rápida recuperación hematológica dentro de 2-3 semanas en los pacientes con reserva normal de médula ósea sin importar la dosis (Emadi et al. 2009). Dados estos efectos inducidos por la quimioterapia, se evaluó el efecto que tenía la combinación del ICRP+CYP sobre las PBMC.

Los resultados demuestran que de manera independiente, el ICRP no induce citotoxicidad significativa sobre las PBMC, aun a la concentración más alta (CC50) la citotoxicidad del ICRP es muy baja. Esto es congruente con estudios previos en donde se demostró que el ICRP no afecta la viabilidad de las PBMC humanas (Lorenzo Anota et al. 2020) comprobando la selectividad del ICRP hacia células tumorales. Por otro lado, el tratamiento con la ciclofosfamida (CC20 y 50) muestra elevada citotoxicidad sobre las PBMC, lo que es de esperarse dados los efectos tóxicos de la CYP sobre las células del sistema inmune. Sin embargo, al combinar los tratamientos ICRP+CYP en ninguno de los ratios evaluados (1+50, 50+1, 20+20 y 50+50) se induce muerte celular mayor que la inducida por los agentes de manera independiente, incluso en las combinaciones en donde la CYP se encuentra en mayor concentración. Un comportamiento similar se había observado en estudios previos en donde se determinó que el ICRP tiene capacidad quimioprotectora contra el daño inducido por el 5-FU en células de la médula ósea tales como leucocitos, granulocitos y poblaciones eritroides, mostrando a nivel sistémico valores hematológicos normales de leucocitos y glóbulos rojos en un modelo murino (Coronado Cerda et al. 2016). De acuerdo con estos resultados previos el ICRP no afecta el ciclo celular de las PMBC, indicando que las células permanecen en un estado normal y que el mecanismo de protección no es a través de un arresto. Además, se encontró que el ICRP es capaz de disminuir la formación de ROS y de inducir la activación de Nfr2 en las células de ratones tratados con 5-FU, sugiriendo que el ICRP puede actuar como molécula captadora de radicales libres en función de proteger a las células del daño inducido por la quimioterapia.

Por otro lado, también se ha evaluado el efecto de la combinación de la CYP con agentes como el resveratrol sobre células normales. De forma congruente con nuestros resultados, a pesar de no observarse una protección de las células sanas, se encontró que la citotoxicidad inducida por la quimioterapia, no se ve potenciada al realizar la combinación que sinergiza contra células de cáncer de mama (Singh et al. 2009).

Se han realizado estudios con el fin de determinar si la CYP es la responsable de los efectos citotóxicos sobre células no tumorales, encontrando que por sí misma no es citotóxica, sino que son sus metabolitos los que causan el daño, sugiriendo que la acroleína juega un papel principal, ya que se ha implicado en los daños cardíacos (DeJarnett et al.

2014), en la cistitis hemorrágica (Cox 1979), así como en los daños hepáticos (DeLeve 1996); y se han relacionado estos efectos con un aumento en las ROS ya que el NAC es capaz de revertir la cardiotoxicidad (Kurauchi et al. 2017).

En este contexto, el ICRP podría actuar como reductor de las ROS inducidas por la CYP o sus metabolitos dado que también se ha demostrado que el ICRP disminuye los oxidantes al incrementar la actividad antioxidante del glutatión, superóxido dismutasa y catalasa (principales antioxidantes de la célula) en macrófagos peritoneales humanos estimulados con LPS (Franco Molina et al. 2011). Esto lleva a pensar que este mecanismo podría estar implicado en la citotoxicidad inducida por la combinación de ICRP+CYP en las PBMC. Sin embargo, se tendría que evaluar la formación de ROS, así como la inhibición de las mismas para determinar el rol que cumplen en la citotoxicidad del tratamiento combinado de ICRP+CYP para comprobar esta teoría.

No obstante, las terapias combinatorias pretenden reducir los efectos secundarios a través de la disminución de las dosis requeridas de cada fármaco individual, sin perder el potencial citotóxico (Mokhtari et al. 2017). En esta investigación se logró la disminución de la concentración de la CYP hasta la mitad en los dos radios evaluados (1+50 y 50+50), conservando el efecto citotóxico en las células tumorales, mientras que no afectó la citotoxicidad sobre las células sanas.

## **8.2 Alteraciones mitocondriales inducidas en el proceso de muerte**

Como se mencionó, las mitocondrias juegan un papel fundamental en los mecanismos de MCR. Dado que la permeabilización de la membrana mitocondrial externa es un paso crítico y se ha clasificado como un “punto de no retorno” a la muerte celular ya que conduce a la caída del potencial de membrana mitocondrial, se decidió evaluar si el tratamiento con ICRP, la CYP y las combinaciones ICRP+CYP inducen este daño mitocondrial.

Estudios previos han demostrado que el tratamiento con ICRP induce pérdida de potencial de membrana mitocondrial en células HeLa, A549, A427, MCF-7 y MDA-MB-231 (Martínez Torres et al. 2018, 2019; Álvarez Valadez 2018; Guzmán Aguillón 2018). Por otro lado, existe poca evidencia reportada de los efectos de la CYP sobre la membrana mitocondrial, sin embargo se ha determinado que su vía de muerte involucra cambios del

potencial de membrana mitocondrial en células A432 (Yang et al. 2011) y S-180 inoculadas en ratón (Li et al. 2011).

Además, los resultados de esta tesis demostraron que el ICRP induce pérdida de potencial de membrana mitocondrial similar a como se había reportado previamente sobre las células MCF-7 y MDA-MB-231 (Guzmán Aguillón 2018); por otro lado la CYP a la CC50 también induce cambios en el potencial de membrana mitocondrial congruentes a lo observado previamente sobre otras líneas celulares (Yang et al. 2011). Sin embargo, a dosis más bajas a las estudiadas previamente (CC1 y 20) y en sus combinaciones (1+50, 50+1, 20+20 y 50+50) se induce daño mitocondrial mayor a la muerte celular inducida sobre MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1, lo que podría sugerir que la pérdida de potencial de membrana mitocondrial es un evento más temprano a la muerte celular. No obstante, el daño mitocondrial se podría dar tanto por el tratamiento directamente, o por mediadores como las ROS, por lo que para comprobar cual evento ocurre primero hacen falta ensayos adicionales con el uso de antioxidantes.

Previamente Li y colaboradores en el 2011 también evidenciaron una mayor pérdida del potencial de membrana mitocondrial al realizar combinaciones de un polisacárido obtenido de *Ganoderma atrum* (PSG-1) con la ciclofosfamida que la inducida por el tratamiento independiente (Li et al. 2011).

La mitocondria es una de las principales fuentes de ROS en la célula, las cuales funcionan como segundos mensajeros en niveles controlados, sin embargo, su producción desmesurada puede terminar dañando los componentes de la célula y conducirla a la muerte (Ryter et al. 2007). Por ello, se buscó determinar si el tratamiento con ICRP, CYP y la combinación ICRP+CYP inducía estrés oxidativo.

Los resultados de esta tesis demuestran que la producción de ROS aumenta de manera significativa tanto en células MCF-7, como en MDA-MB-231 y 4T1 al tratarlas con el ICRP (CC1, 20 y 50), concordando con lo reportado por Martínez Torres y colaboradores sobre células HeLa, A549, A427, MCF-7 y MDA-MB-231 (Martínez Torres et al. 2018, 2019; Guzmán Aguillón, 2018). En conjunto estos reportes señalan la importancia de las ROS en la toxicidad inducida por el ICRP, al observarse un aumento de las mismas en las células tumorales, independientemente del tejido del que provengan.



Existe evidencia de que agentes quimioterapéuticos como los agentes alquilantes generan altos niveles de ROS por reducción de los niveles de glutatión (los principales antioxidantes celulares) (Conklin 2004). En relación a la CYP se ha reportado que media un incremento de la generación de ROS (Jeelani et al. 2017), principalmente por sus metabolitos (Turton et al. 2007; Strauss et al. 2008; Yoshida et al. 2009; Kurauchi et al. 2017; Jeelani R. et al. 2017). Estos reportes en conjunto con el presente trabajo indican que el tratamiento con CYP induce la formación de ROS, evidenciado aquí en una forma proporcional a la muerte celular inducida en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231; destacando que la línea 4T1 al ser tratada con la CC20 y 50 de CYP y la CC20 de ICRP, se induce un mayor estrés oxidativo a la muerte celular, lo que pudiera también estar implicado en una mayor sensibilidad de esta línea al tratamiento con CYP e ICRP, dada la importancia de las ROS en la muerte celular inducida por ambos tratamientos.

Además, al evaluar la producción de ROS por el tratamiento combinado de ICRP+CYP (1+50, 50+1, 20+20 y 50+50), en todos los casos se induce una mayor producción de ROS comparada a los agentes independientes en las tres líneas tumorales. Esto no se observa con la combinación 50+1 en las líneas TNBC (MDA-MB-231 y 4T1) ya que no se observa un incremento de ROS de manera significativa con respecto al ICRP y la CYP. Lo que destaca la importancia del estrés oxidativo en el proceso de muerte inducida por la combinación de ICRP+CYP. En esta última es en la que no se observa una potenciación de la muerte celular, señalando que el ICRP potencia la muerte de la CYP implicando un estrés oxidativo que sobrepasa el inducido por los agentes de manera independiente. Investigaciones anteriores han estudiado también la formación de ROS inducida por la combinación de otros agentes con la CYP, concordando con los resultados aquí reportado, como el caso del uso combinado con DMSE (difenilmetil selenocianato), en donde determinaron un incremento en los niveles de ROS después del tratamiento con CYP. Sin embargo, la combinación de CYP en dos diferentes esquemas de tratamiento con DMSE condujo sinérgicamente a la generación de ROS en las células tumorales. La combinación de CYP+DMSE significativamente disminuyó los niveles de glutatión (GSH) en las células tumorales, mayor a la inducida por los tratamientos en monoterapia. Además de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión S-transferasa (GST) que también se regularon a la baja, llevando a las células

a una inhibición de la capacidad antioxidante que sobrepasó las ROS generadas (Chakraborty et al. 2016).

En conjunto estos resultados sugieren una desregulación de los sistemas antioxidantes de las células tumorales. Por ello, una perspectiva interesante sería la evaluación de estos sistemas tanto en células cancerosas como en sanas, después de la combinación de ICRP+CYP, con el fin de determinar si se encuentran regulados selectivamente.

### **8.3 Mediadores bioquímicos de la muerte celular**

Dado que la mitocondria está involucrada en la activación de mecanismos efectores de muerte celular regulando la translocación de proteínas proapoptóticas al citosol, como el citocromo C que conduce a la activación de caspasas, se decidió evaluar si el tratamiento con la combinación de ICRP+CYP inducen la activación de las mismas. Para ello se seleccionaron los radios con mayor efecto citotóxico (1+50 y 50+50).

Las caspasas involucradas en la muerte celular se dividen iniciadoras (las cuales funcionan principalmente para activar caspasas posteriores en una cascada proteolítica) - 2, -8, -9 y -10, y caspasas efectoras -3, -6 y -7 (que se activan mediante caspasas iniciadoras y que son responsables de los eventos proteolíticos que conducen al fenotipo apoptótico). En esta investigación se evaluó mediante TF2-VAD-FMK la actividad enzimática de las caspasas tanto iniciadoras, como efectoras, observando que el ICRP (CC50) induce la activación de caspasas en las tres líneas evaluadas, aunque en una menor proporción a la muerte celular. Anteriormente se había demostrado, mediante métodos colorimétricos, que el ICRP induce activación de caspasas 3/7, 8 y 10 en células HeLa (Martínez Torres 2008). Posteriormente, también sobre células HeLa, se observó un comportamiento similar a lo reportado en esta investigación, encontrando una ligera activación de la caspasa 3 (principal caspasa efectora) al aplicar la CC50 de ICRP durante 24 h, sin embargo, una muerte independiente de su activación (Martínez Torres et al. 2018).

Por otro lado, en los resultados se muestra que la CYP (CC50) induce la activación de caspasas en las tres líneas de cáncer de mama, como se ha reportado anteriormente sobre células MCF-7 (Singh et al. 2009). Además, es bien sabido que la CYP induce apoptosis en células MCF-7 y MDA-MB-231 (Chow y Loo 2003), concordando con los resultados

aquí obtenidos. No obstante, a pesar de que en todos los casos, se induce activación de caspasas por el tratamiento con CYP, esta se observa mayor en las células MCF-7. Previamente, se relacionó el incremento de caspasas con la regulación de proteínas pro-apoptóticas más tempranamente en MCF-7 cuando se comparó con MDA-MB-231 al tratarlas con la CYP (Chow y Loo 2003). Esto podría explicar nuestros resultados observados en esta línea, sin embargo, sería necesario evaluar la regulación de proteínas pro y anti-apoptóticas inducidas por los tratamientos para comprobar este razonamiento.

Conjuntamente, los resultados muestran que al combinar los tratamientos de ICRP+CYP en los radios 1+50 y 50+50, se observa la activación de caspasas de manera casi proporcional a la muerte celular inducida, excepto en el caso de las MDA-MB-231 en donde la activación de las caspasas es ligeramente menor comparada con las otras líneas y a la muerte observada con esas combinaciones, esto pudiera señalar la participación de otros mediadores bioquímicos relevantes en la muerte inducida sobre las células MDA-MB-231. Anteriormente también se ha evidenciado un incremento de la activación de caspasas 8 y 9 inducido por la combinación de CYP con resveratrol, significativamente mayor al observado por estos tratamientos de manera independiente en células MCF-7 (Singh et al. 2009), de manera semejante a lo aquí reportado en las MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1.

#### **8.4 Efectores de la muerte celular inducida por los tratamientos**

Dado que la activación de caspasas no indica que la muerte celular sea apoptosis, se analizó la implicación de las mismas en el mecanismo de muerte en presencia del inhibidor de caspasas, Q-VD-OPh.

Los resultados muestran por primera vez que el ICRP no induce apoptosis en las células MDA-MB-231 y 4T1, ya que la muerte celular ocurrió, aún en presencia del inhibidor. La muerte celular independiente de caspasas también se ha observado en otros cánceres por el tratamiento con ICRP, como en HeLa, A549, A427 y MCF-7 (Martínez Torres et al. 2018, 2019; Martínez Loria 2017).

Contrario al ICRP, el uso del inhibidor de caspasas, bloqueó la apoptosis inducida por la CYP en las tres líneas celulares evaluadas, evidenciando que la activación de caspasas es necesaria para que se lleve a cabo la muerte celular. Esta inhibición de la muerte celular

inducida por CYP también se ha evidenciado antes con el uso de inhibidores específicos de caspasas sobre células MCF-7 y 9L (Singh et al. 2009; Schwartz y Waxman 2001).

Por otro lado, los resultados evidencian que la muerte celular inducida por las combinaciones 1+50 y 50+50 es independiente de caspasas en MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1. Otras combinaciones farmacológicas previamente estudiadas también han evidenciado un efecto independiente de caspasas como la Mn porfirina en combinación con ascorbato (Evans et al. 2014), sin embargo, también existen reportes de muerte celular mediada por caspasas por combinaciones como la de la ciclofosfamida con resveratrol en MCF-7 (Singh et al. 2009). En este trabajo de tesis, se demostró que la combinación de ICRP+CYP en los dos radios evaluados induce muerte celular independiente de caspasas, lo cual podría ser ventajoso debido a que las células tumorales con frecuencia albergan defectos en la vía de apoptosis y por lo tanto son menos sensibles a los agentes inductores de este tipo de muerte celular (Suparji et al. 2016), por lo que esta combinación podría ser usada para evitar la resistencia a la apoptosis en células tumorales.

Dado que ninguna de las combinaciones es dependiente de caspasas, se evaluó a las ROS como posibles efectores de la muerte celular utilizando el antioxidante y precursor del glutatión, la N-acetilcisteína.

Los resultados indican que la muerte celular inducida por el ICRP es dependiente de la formación de ROS, ya que al utilizar el inhibidor, la muerte celular se disminuye en MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1. Este resultado es consistente con los resultados previos del tratamiento individual, ICRP, sobre las líneas HeLa, A549, A427, MCF-7 y MDA-MB-231 (Martínez Torres et al. 2018, 2019; Guzmán Aguillón 2018), lo que parece indicar que el ICRP induce un mecanismo de muerte celular conservado en células de tumores sólidos. Esto nos permite retomar la importancia del alto estrés oxidativo observado en las células 4T1 al ser tratadas aún con concentraciones bajas del ICRP (CC20) y posiblemente la sensibilidad de estas células al ICRP dada la función crítica de las ROS en su mecanismo de muerte.

Por otro lado, la muerte celular inducida por la CYP no disminuyó significativamente al inhibir las ROS con el antioxidante, indicando que la CYP induce muerte celular independiente de ROS en las líneas MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1.

Además, al combinar los tratamientos de ICRP+CYP en el ratio 1+50 se demostró que la muerte celular es dependiente de ROS en las tres líneas celulares y la combinación 50+50 en las líneas TNBC, ya que la muerte se inhibió al utilizar el antioxidante, NAC. Estos resultados se muestran por primera vez en la combinación de ICRP+CYP. Otras combinaciones también han observado dependencia de ROS en la muerte celular, como el caso de la combinación de DHA con fármacos anticancerígenos de nueva generación (everolimus y barasertib) donde la muerte celular sinérgica es dependiente de ROS en las células Jurkat (Zhelev et al. 2016).

No obstante, es necesario indagar más en posibles efectores de la muerte celular de la combinación 1+50 y 50+50 en MCF-7, ya que en la primera, la inhibición con NAC fue muy baja, y en la última, no se inhibió la muerte al utilizar el NAC, ni el QVD.

## **8.5 Alteraciones nucleares y morfológicas**

Una de las principales características de la MCR es la degradación del ADN (Galluzzi et al. 2018). Diferentes tipos de endonucleasas activadas durante distintos tipos de MCR, cortan secciones del DNA internucleosomal y causan una extensa fragmentación del DNA (Leist y Jäättelä 2001). La degradación del ADN se ha convertido en un blanco crucial para la inducción de muerte celular, sin embargo, se debe considerar que el bloqueo de las enzimas degradadoras del ADN, no previene la muerte celular durante la apoptosis, indicando que el núcleo no es siempre un primer blanco de la apoptosis y que los procesos del citoplasma pueden jugar un papel principal en la iniciación de la MCR (Nakajima et al. 1995).

En este estudio se mostró que el ICRP induce degradación del ADN como un evento tardío de la inducción de la muerte celular, ya que se observó hasta las 24 h de tratamiento en las células MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1. La degradación del ADN por el tratamiento con ICRP es similar a lo previamente reportado en células MCF-7 a las 72 h de tratamiento (Franco Molina et al. 2006), en HeLa, donde la degradación fue significativa hasta las 48 h, y sobre A549 y A427 a las 24 y 48 h de tratamiento (Martínez Torres et al. 2018, 2019).

Esto mismo se observó para el tratamiento con CYP, en donde la degradación del ADN fue significativa hasta las 24 h de tratamiento en las líneas de cáncer de mama, exceptuando a las MCF-7, en donde a las 12 h de tratamiento la degradación del ADN fue

significativa. Estos resultados se relacionan con el ciclo celular, en donde sólo en MCF-7 se observó que la CC50 de CYP en esta línea, fue el único tratamiento que mostró arresto del ciclo celular, indicando que el arresto en el ciclo celular y la degradación de ADN en estas células por el tratamiento con CYP se dan desde las 12 h. Esto indica que otras características de muerte podrían activarse desde las 12 h, sin embargo haría falta evaluar estas características en fases tempranas.

Al combinar el ICRP+CYP en el radio 1+50 también se observó degradación del ADN significativa hasta las 24 h comparadas con los tratamientos independientes en las tres líneas celulares. No así para la combinación 50+50, en la que esta característica se observa desde las 12 h; excepto en MDA-MB-231. Además, la degradación fue mayor en las células 4T1 comparándolas con las MCF-7 y MDA-MB-231, lo que podría relacionarse con reportes que indican que el daño al ADN es una de las principales características inducida por las quimioterapias, principalmente los agentes alquilantes (Chakraborty et al. 2016) y su uso en las combinaciones, lo cual pudiera también asociarse a la sensibilidad de la línea a los tratamientos. Reportes anteriores mostraron que la combinación de CYP con el resveratrol y el DMSE también induce la degradación del ADN en una manera mayor a la inducida por el tratamiento en monoterapia, aunque señalan una correlación positiva del incremento del daño al ADN con un incremento de las ROS. Que conduce a un incremento de la muerte por la vía de la apoptosis en las células tumorales (Singh et al. 2009; Chakraborty et al. 2016), por lo que sería interesante determinar si esto también ocurre en la combinación ICRP+CYP.

Los resultados aquí mostrados nos indican que la degradación del ADN no juega un rol principal en la muerte celular inducida por los tratamientos y sus combinaciones, sino que es una consecuencia del proceso.

La muerte celular se manifiesta con alteraciones morfológicas macroscópicas que históricamente se emplearon para distinguir la muerte celular, aunque la NCDD ya no emplea estas características para definir a la muerte celular dadas sus múltiples limitaciones y a la identificación de criterios para la clasificación de la MCR (Galluzzi et al. 2018).

Al observar las micrografías de campo claro de las células tratadas con ICRP durante 24 h se observa la disminución de la confluencia celular, así como la formación de vacuolas intracelulares que se observan con mayor claridad en las células MCF-7 y 4T1. En las células HeLa y MCF-7 se demostró que estas vesículas corresponden a autofagosomas prosupervivencia; ya que al inhibir su formación, la muerte celular inducida por el ICRP incrementa (Álvarez Valadez, 2018).

Por otro lado, luego del tratamiento con CYP, se observa que las células pierden su forma normal, ya que adquieren un morfotipo apoptótico, con una disminución de su tamaño, un redondeamiento de la célula y la formación de cuerpos apoptóticos, sin embargo, en las células MCF-7 también se pueden observar la formación de vesículas por el tratamiento con CYP. La formación de autofagosomas también se ha documentado en células tumorales tratadas con dosis metronómicas de ciclofosfamida (Chow et al. 2014).

Además, al combinar los tratamientos ICRP+CYP en los dos radios analizados (1+50 y 50+50), se observa una disminución de la confluencia celular, las células pierden su forma normal en agregados poligonales, las células se desprenden y se pueden observar restos celulares. No se distinguen vesículas, y las células adquieren una morfología similar a la inducida por la CYP de manera independiente; lo que indica que a pesar de que la muerte celular inducida por la combinación ICRP+CYP depende de ROS y no de caspasas (contrario a la CYP), las características que regulan la morfología de la muerte celular se predominan por las involucradas en el tratamiento con la ciclofosfamida, confirmando que es el ICRP el que potencia la citotoxicidad inducida por la CYP y no viceversa. Sin embargo, deberían realizarse estudios futuros indagando en las características morfológicas de la muerte celular inducida por la combinación ICRP+CYP para entender mejor este proceso.

La forma de muerte celular inducida por el ICRP y la combinación de ICRP+CYP en donde la producción de ROS es crítica para la inducción de muerte celular también se ha reportado recientemente sobre células HeLa. Diversos mecanismos de muerte celular se han descrito por ser independientes de caspasas, pero dependiente de la producción de ROS, unas de las cuales se describieron anteriormente en la tabla 2. Por ejemplo, una forma de MCR caracterizada por ser independiente de caspasas, pero dependiente de ROS se describió recientemente bajo el nombre de oxeiptosis, cuya señalización de muerte

celular involucra interacciones entre KEAP1 (un sensor de ROS), la fosfatasa PGAM5, y el factor proapoptótico AIFM1 (Holze et al. 2018). La citotoxicidad de la combinación del ICRP+CYP y del ICRP de manera independiente, comparten algunas características similares con este tipo de muerte celular, como la despolarización de la mitocondria, producción de ROS, la degradación de ADN y morfología similar a la apoptótica (en el caso de la combinación ICRP+CYP). Sin embargo, hacen falta evaluaciones en las moléculas de señalización para determinar si el mecanismo de muerte celular inducido por estos tratamientos es oxeiptosis, especialmente porque la producción de ROS está relacionada a otros tipos de muerte celular independientes de caspasas. Uno de los mejores conocidos es partanatos, el cual es iniciado por hiperactivación de PARP1 y precipitado por catástrofe bioenergética consecuente, acoplada a degradación del ADN dependiente de AIF y MIF (Galluzzi et al. 2018) y puede ser inducido por la sobreproducción de ROS, ya que su inhibición, utilizando NAC mostró inhibir todos estos efectos (Wang et al. 2018).

Por lo tanto, se deben realizar análisis más detallados para un mejor entendimiento del rol de las ROS en el mecanismo de muerte celular inducido por el ICRP y la combinación ICRP+CYP.

## **8.6 Capacidad molecular de muerte celular inmunogénica**

En los últimos años, se ha propuesto que una forma de reactivar potentes respuestas inmunes antitumorales es acentuar la inmunogenicidad de las células cancerosas mediante la emisión de señales de daño o DAMPs. Recientemente se demostró que la inducción de una vía de muerte celular llamada “muerte celular inmunogénica” (ICD), es definida como una forma funcionalmente distinta de MCR que facilita el establecimiento de una respuesta inmune adaptativa gracias a la emisión de DAMPs, aumentando la inmunogenicidad de las células moribundas (Kepp et al. 2014).

Por lo tanto, una vez evaluadas las características de la muerte celular inducida por ICRP+CYP, se evaluó la inmunogenicidad de la muerte, determinando la exposición o liberación de DAMPs involucrados en ICD, que son la calreticulina (CRT) y el ATP (Garg et al. 2015).



El primer DAMP evaluado fue la exposición de CRT, ya que ha sido reportada por ser uno de los principales DAMPs necesarios para la correcta maduración de las células dendríticas y la presentación de antígenos (Garg et al. 2015). Además, se ha reportado previamente que el ICRP induce la exposición de CRT en células B16F10 (Rodríguez Salazar et al. 2017) y actualmente en nuestro equipo de investigación sobre células de cáncer de mama (Reyes Ruiz 2020, datos no publicados). Aquí se demostró que el ICRP es capaz de inducir la exposición de CRT en células MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1; con lo que se confirma que el ICRP es capaz de inducir exposición de CRT en otros tipos de células tumorales.

Por otro lado, también se ha destacado que solo un número limitado de inductores de muerte celular pueden promover ICD a través de la activación diferencial de estrés en el retículo y de la exposición de CRT en el curso de MCR; estos inductores incluyen a la ciclofosfamida (Garg et al. 2017). Congruentemente, se observó que el tratamiento con CYP induce la exposición de CRT en células MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1, confirmando lo observado en estudios previos (Schiavoni et al. 2010; Sistigu et al. 2011).

Además, la combinación del ICRP con una quimioterapia que también se ha determinado que induce ICD, el oxaliplatino, indujo la más alta exposición de CRT cuando se comparó a los tratamientos individuales (Rodríguez Salazar et al. 2017). De igual forma, estos resultados evidencian un incremento de la exposición de CRT inducida por la combinación de ICRP+CYP en ambos radios estudiados (1+50 y 50+50) en las líneas MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1, exceptuando a línea MCF-7 con el tratamiento 1+50 que la elevación de la exposición de CRT no fue significativa con respecto a los tratamientos individuales.

Otro DAMP importante en ICD, es la liberación de ATP. El ATP es reconocido por receptores purinérgicos (P2Y2 y P2X7), los cuales inducen la migración de células fagocíticas y promueven la liberación de citocinas que culminan en la activación de respuesta inmunes antitumorales específicas de antígeno (Krysko et al. 2012). Los resultados muestran la liberación de ATP inducida por el ICRP en las tres líneas celulares, en donde a pesar que la línea 4T1 es poco inmunogénica, puede inducir la liberación de DAMPs. Estos resultados se correlacionan con lo observado por Rodríguez Salazar en el

2017 sobre B16F10 al determinar que el tratamiento con ICRP induce la liberación de ATP. A la fecha no existen reportes de que la ciclofosfamida también induzca la liberación de ATP, sin embargo se ha puesto previamente como perspectiva dado que se sabe que libera otros DAMPs como HMGB1 (Schiavoni et al. 2010); confirmando en conjunto con nuestros resultados su capacidad para inducir la liberación de DAMPs. Además, otras investigaciones también evalúan la capacidad de la terapia combinada de ciclofosfamida con inmunoterapias, (Schiavoni et al. 2010; Chen et al. 2014).

En conjunto estos resultados nos llevan a proponer que el ICRP+CYP representa una combinación quimio-inmunoterapéutica efectiva. Por una parte, el mecanismo de muerte celular inducido por la combinación del ICRP+CYP presenta beneficios terapéuticos importantes, ya que se podría presentar aún bajo condiciones defectuosas de caspasas, dado que algunas células tumorales presentan mutaciones o deficiencias funcionales en proteínas asociadas a la vía de muerte apoptótica (Giampazolias y Tait 2018). Por otro lado, aunque la presencia de los DAMPs no es evidencia suficiente para garantizar la inducción de ICD, futuras investigaciones podrían realizarse para determinar si esta estrategia combinada de ICRP+CYP es un inductor de ICD (Garg et al. 2015).

Por todo lo anterior, este trabajo evidencia la relevancia de los agentes quimioterapéuticos que se usan ampliamente en el tratamiento del cáncer, que aunque sus mecanismos de acción se han entendido en términos de contrarrestar el proceso tumoral, su capacidad de sinergizar la muerte en combinación con inmunoterapias está aumentando su reconocimiento como estrategias terapéuticas efectivas. La efectividad de estas combinaciones depende de múltiples variables, lo que destaca la necesidad de comprender la biología subyacente de estas respuestas y no solo de inducir un efecto antitumoral per se.

Esta investigación considera los efectos citotóxicos e inmunoestimulantes de la ciclofosfamida en conjunto con el ICRP desde una perspectiva molecular, destacando su utilización en el contexto de terapias combinatorias.

## 9. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta investigación se concluye que el tratamiento con la combinación de ICRP+CYP induce arresto del ciclo celular en células TNBC y muerte celular regulada de manera sinérgica en células de cáncer de mama. Esta muerte está caracterizada por la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno, la cual es crítica e indispensable para la inducción de la muerte. Además, induce la activación de caspasas aunque no depende de ellas para el mecanismo efector; provoca la degradación del ADN y una morfología celular similar a la apoptótica; y se induce la exposición y liberación de DAMPs.

Finalmente, se observó que la combinación del ICRP+CYP no afecta la citotoxicidad de la ciclofosfamida sobre las PBMC.

Los resultados obtenidos en esta tesis proveen evidencia de una efectiva estrategia terapéutica en el contexto de terapias combinatorias para células de cáncer de mama y destaca la relevancia del entendimiento de los mecanismos que conducen a un sinergismo, a fin de proponer nuevas aplicaciones como la estimulación de respuestas inmunes específicas de tumor.

## 10. PERSPECTIVAS

- Evaluar el mecanismo de liberación de DAMPs y el potencial terapéutico de la combinación de ICRP+CYP como un inductor de muerte celular inmunogénica en un modelo murino de cáncer de mama.
- Determinar la activación de sensores del daño al ADN como la fosforilación de la histona H2AX por el tratamiento de ICRP+CYP, así como el estado de p53.
- Analizar la modulación de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas en respuesta a la combinación de ICRP+CYP.
- Evaluar mayormente las características morfológicas involucradas en la muerte celular inducida por el ICRP en combinación con CYP.
- Indagar en otros efectores de la muerte celular que pudieran estar involucrados en el mecanismo de muerte inducido por el ICRP+CYP.
- Evaluar el efecto aditivo, antagonista o sinérgico del ICRP en combinación con otras quimioterapias de primera línea.
- Analizar el efecto de la combinación de ICRP+CYP sobre otros modelos tumorales *in vitro*.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, T., & Dutta, A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, 9(6), 400-414.
- ACS. 2019. *Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020*. Atlanta.
- ACS. 22 de Noviembre de 2019. *How Chemotherapy Drugs Work*. Disponible en <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work.html>
- Ahlmann, M., & Hempel, G. 2016. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 78, 661-671.
- Álvarez Valadez, K. M. Marzo de 2018. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EL IMMUNEPOTENT CRP EN CÉLULAS HELA Y MCF-7: ROL DE LAS ROS Y LA AUTOFAGIA.
- Bae, S. Y., Nam, S. J., Jung, Y., Lee, S. B., Park, B.-W., Lim, W., . . . Jung, S. P. 2018. Differences in prognosis and efficacy of chemotherapy by p53 expression in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 172, 437-444.
- Caserta, T. M., Smith, A. N., Gultice, A. D., Reedy, M. A., & Brown, T. L. 2003. Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis*, 8(4), 345-352.
- Chakraborty, P., Roy, S. S., Basu, A., & Bhattacharya, S. 2016. Sensitization of cancer cells to cyclophosphamide therapy by an organoselenium compound through ROS-mediated apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*.
- Chen, L., Waxman, D. J., Chen, D., & Kufe, D. W. 1996. Sensitization of Human Breast Cancer Cells to Cyclophosphamide and Ifosfamide by Transfer of a Liver Cytochrome P450 Gene. *Cancer Research*, 56, 1331-1340.
- Chen, N., Ritsma, L. M., & Vrisekoop, N. 2019. In vivo characteristics of human and mouse breast tumor cell lines. *Experimental Cell Research*, 381, 86-93.
- Chen, X., Yang, Y., Zhou, Q., Weiss, J. M., Howard, O. Z., McPherson, J. M., . . . Oppenheim, J. J. 2014. Effective Chemoimmunotherapy with Anti-TGFb

- Antibody and Cyclophosphamide in a Mouse Model of Breast Cancer. *Plos One*, 9(1).
- Choi, Y. H., & Yoo, Y. H. 2012. Taxol-induced growth arrest and apoptosis is associated with the upregulation of the Cdk inhibitor, p21WAF1/CIP1, in human breast cancer cells. *Oncol Rep.*, 28, 2163-2169.
- Chou, T.-C., & Talay, P. 1983. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *TIPS*, 450-455.
- Chow, A., Francia, G., Kouri, A., Lee, C., M. Ebos, J., S. Kerbel, R., & Emmenegger, U. 2014. Impaired Autophagy Mediates Resistance to Low-Dose Metronomic Cyclophosphamide Chemotherapy. *Clinical Cancer Drugs*, 1(2), 116-126.
- Chow, L. W., & Loo, W. T. 2003. The differential effects of cyclophosphamide, epirubicin and 5-fluorouracil on apoptotic marker (CPP-32), pro-apoptotic protein (p21WAF-1) and anti-apoptotic protein (bcl-2) in breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 80, 239-244.
- CIDTA. (s.f.). *Toxicología ambiental*. Disponible en [https://cidta.usal.es/riesgos/CD1/toxicologia\\_contaminacion\\_aire/www.cepis.ops-oms.org/bvsci/e/fulltext/toxicol/leccion3.pdf](https://cidta.usal.es/riesgos/CD1/toxicologia_contaminacion_aire/www.cepis.ops-oms.org/bvsci/e/fulltext/toxicol/leccion3.pdf)
- Coeffic, D., Antoine, E., & Khayat, D. 2002. Quimioterapia antitumoral. 47-83.
- Comsa, S., Cimpean, A. M., & Raica, M. 2015. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*, 35, 3147-3154.
- Conklin, K. A. 2004. Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness. *Integrative Cancer Therapies*, 3(4), 294-300.
- Coronado Cerda, E. E., Franco Molina, M. A., Mendoza Gamboa, E., Prado García, H., Rivera Morales, L., Zapata Benavides, P., . . . Rodríguez Padilla, C. 2016. In Vivo Chemoprotective Activity of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract in Mouse Bone Marrow Cells against Damage Induced by 5-Fluorouracil. *Journal of Immunology Research*.
- Cox, P. J. 1979. Cyclophosphamide cystitis—identification of acrolein as the causative agent. *Biochem Pharmacol*, 28, 2045-2049.

- DeJarnett, N., Conklin, D. J., Riggs, D., Myers, J. A., O'Toole, T. E., Hamzeh, I., & al., e. 2014. Acrolein exposure is associated with increased cardiovascular disease risk. *Journal of the American Heart Association*, 3(4).
- DeLeve, L. D. 1996. Cellular target of cyclophosphamide toxicity in the murine liver: role of glutathione and site of metabolic activation. *Hepatology*, 24, 830-837.
- ECACC. 2017. Cell line profile. MDA-MB-231. *ECACC*, 1-3.
- Emadi, A., Jones, R. J., & Brodsky, R. A. 2009. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Clinical Oncology*, 6, 638-647.
- Evans, M. K., Tovmasyan, A., Batinic-Haberle, I., & Devi, G. R. 2014. Mn Porphyrin in combination with ascorbate acts as a pro-oxidant and mediates caspase-independent cancer cell death. *Free Radic Bio Med.*, 68, 302-314.
- Franco Molina, M. A., Mendoza Gamboa, E., Castillo León, L., Támez Guerra, R. S., & Rodríguez Padilla, C. 2005. Bovine Dialyzable Leukocyte Extract Modulates the Nitric Oxide and Pro-Inflammatory Cytokine Production in Lipopolysaccharide-Stimulated Murine Peritoneal Macrophages In Vitro. *Journal of Medicinal Food*, 8(1), 20-26.
- Franco Molina, M. A., Mendoza Gamboa, E., Miranda Hernández, D., Zapata Benavides, P., Castillo León, L., Isaza Brando, C., . . . Rodríguez Padilla, C. 2006. In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells. *Cytotherapy*, 8(4), 408-414.
- Franco Molina, M. A., Mendoza Gamboa, E., Miranda Hernández, D. F., Sierra Rivera, C. A., Zapata Benavides, P., Vera García, M. E., . . . Rodríguez Padilla, C. 2011. Anti-inflammatory and antioxidant effects of IMMUNEPOTENT CRP in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages. *African Journal of Microbiology Research*, 5(22), 3726-3736.
- Franco Molina, M., Mendoza Gamboa, E., Zapata Benavides, P., Vera García, M. E., Castillo Tello, P., García de la Fuente, A., . . . Rodríguez Padilla, C. 2008. IMMUNEPOTENT CRP (bovine dialyzable leukocyte extract) adjuvant immunotherapy: a phase I study in non-small cell lung cancer patients. *Cytotherapy*, 10(5), 490-496.

- Frei, E., Karon, M., Levin, R. H., Freireich, E. J., Taylor, R. J., Hananian, J., . . . Moon, J. H. 1965. The Effectiveness of Combinations of Antileukemic Agents in Inducing and Maintaining Remission in Children with Acute Leukemia. *Blood*, 26(5), 642-656.
- Galluzzi, L., & Ilio, V. 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25, 486-541.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., . . . Kroemer, G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19, 107-120.
- García Foncillas, J., Bandrés, E., Catalán, V., García Amigot, F., & Zabalegui, N. 2001. Basic concepts in the molecular biology of cancer. Genetic susceptibility. *ANALES Sis San Navarra*, 24(1), 31-54.
- Garg, A. D., Dudek-Peric, A. M., Romano, E., & Agostinis, P. 2015. Immunogenic cell death. *The International Journal of Developmental Biology*, 59, 131-140.
- Garg, A. D., More, S., Rufo, N., Mece, O., Sassano, M. L., Agostinis, P., . . . Galluzzi, L. 2017. Trial watch: Immunogenic cell death induction by anticancer chemotherapeutics. *Oncoimmunology*, 6(12).
- Ghuwalewala, S., Ghatak, D., Das, P., Dey, S., Sakar, S., Alam, N., . . . Roychoudhury, S. 2016. CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup> molecular signature determines the Cancer Stem Cell and EMT phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Stem Cell Research*, 16(2), 405-417.
- Giampazolias, E., & Tait, S. W. 2018. Caspase-independent cell death: An anti-cancer double whammy. *Cell cycle*, 17(3), 269-270.
- Giono, L. E., & Manfredi, J. J. 2006. The p53 Tumor Suppressor Participates in Multiple Cell Cycle Checkpoints. *Journal of Cellular Physiology*, 209, 13-20.
- Goldstein, M., Roos, W. P., & Kaina, B. 2008. Apoptotic death induced by the cyclophosphamide analogue mafosfamide in human lymphoblastoid cells: Contribution of DNA replication, transcription inhibition and Chk/p53 signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 229(1), 20-32.



- Guzman Aguillón, O. L. Marzo de 2018. Estudio de la muerte celular inducida por el IMMUNEPOTENT CRP en líneas celulares de cáncer de mama y su efecto en combinación con ciclofosfamida o epirubicina. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144.
- Holze, C., Michaudel, C., Mackowiak, C., Haas, D., Benda, C., Hubel, P., . . . Pichlmair, A. 2018. Oxeiptosis – a ROS induced caspase-independent apoptosis-like cell death pathway. *Nature Immunology*, 19(2), 130-140.
- Ivanova, D., Zhelev, Z., Aoki, I., Bakalova, R., & Higashi, T. 2016. Overproduction of reactive oxygen species – obligatory or not for induction of apoptosis by anticancer drugs. *Chinese Journal of Cancer Research*, 28(4), 383-396.
- Jeelani, R., Khan, S. N., Shaeib, F., Kohan-Ghadr, H. R., Aldhaheri, S. R., Najafi, T., . . . Abu-Soud, H. M. 2017. Cyclophosphamide and acrolein induced oxidative stress leading to deterioration of metaphase II mouse oocyte quality. *Free Radical Biology and Medicine*, 110, 11-18.
- Jeelani, R., Khan, S. N., Shaeib, F., Kohan-Ghadr, H. R., Aldhaheri, S. R., Najafi, T., . . . Abu-Soud, H. M. 2017. Cyclophosphamide and acrolein induced oxidative stress leading to deterioration of metaphase II mouse oocyte quality. *Free Radical Biology and Medicine*, 110, 11-18.
- Kenny, P. A., Lee, G. Y., Myers, C. A., Neve, R. M., Semeiks, J. R., Spellman, P. T., . . . Bissell, M. J. 2007. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Molecular Oncology*, 1, 84-96.
- Kepp, O., & Laura Senovilla, I. V. 2014. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology*, 3(9).
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., & Zitvogel, L. 2013. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annual Review of Immunology*, 31, 51-72.
- Krysko, D. V., Garg, A. D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Agostinis, P., & Vandenabeele, P. 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews*, 12.

- Kurauchi, K., Nishikawa, T., Miyahara, E., Okamoto, Y., & Kawano, Y. 2017. Role of metabolites of cyclophosphamide in cardiotoxicity. *BMC Research Notes*, 10, 406-416.
- Lara, H. H., Iztepan Turrent, L., Garza Treviño, E. N., Tamez Guerra, R., & Rodríguez Padilla, C. 2010. Clinical and immunological assessment in breast cancer patients receiving anticancer therapy and bovine dialyzable leukocyte extract as an adjuvant. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1, 425-431.
- Leist, M., & Jäättelä, M. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 589-598.
- Li, C. I., Uribe, D. J., & Darling, J. R. 2005. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *British Journal of Cancer*, 93, 1046-1052.
- Li, W., Nie, S., Wang, Y., Li, C., & Xie, M. 2011. Enhancement of Cyclophosphamide-Induced Antitumor Effect by a Novel Polysaccharide from *Ganoderma atrum* in Sarcoma 180-Bearing Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3707-3716.
- Liberman, A. C., Druker, J., Refojo, D., & Arzt, E. 2008. Mecanismos moleculares de acción de algunas drogas inmunosupresoras. *Medicina*, 68(6), 455-464.
- Lorenzo Anot, H. Y., Martínez Torres, A. C., Scott Algara, D., Tamez Guerra, R. S., & Rodríguez Padilla, C. 2020. Bovine Dialyzable Leukocyte Extract IMMUNEPOTENT-CRP Induces Selective ROS-Dependent Apoptosis in T-Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines. *Journal of Oncology*, 2020. doi:<https://doi.org/10.1155/2020/1598503>
- Luo, Q., Zhang, L., Luo, C., & Jiang, M. 2019. Emerging strategies in cancer therapy combining chemotherapy with immunotherapy. *Cancer Letters*, 454, 191-203.
- Martínez Loria, A. B. Diciembre de 2017. Estudio del mecanismo citotóxico inducido por el IMMUNEPOTENT-CRP sobre líneas celulares de cáncer MCF-7, A549 y HeLa: Rol de las especies reactivas de oxígeno.
- Martínez Torres, A. C. Febrero de 2008. Estudios bioquímicos del IMMUNEPOTENT CRP y de su mecanismo de citotoxicidad sobre células HeLa.

- Martínez Torres, A. C., Gómez Morales, L., Martínez Loria, A., Uscanga Palomeque, A. C., Vázquez Guillen, J. M., & Rodríguez Padilla, C. 2019. Cytotoxic activity of IMMUNEPOTENT CRP against non-small cell lung cancer cell lines. *PeerJ*.
- Martínez Torres, A. C., Reyes Ruiz, A., Benítez Londoño, M., Franco Molina, M., & Rodríguez Padilla, C. 2018. IMMUNEPOTENT CRP induces cell cycle arrest and caspase-independent regulated cell death in HeLa cells through reactive oxygen species production. *BMC Cancer*, 18(13), 1-13.
- Martínez Torres, A. C., Uscanga Palomeque, A. C., & Rodríguez Padilla, C. 2016. Actividad citotóxica in vitro frente a células tumorales. *Investigación en plantas de importancia médica*, 269-312.
- Meléndez, A., & Levine, B. 2009. Autophagy in *C. elegans*. *Wormbook*, 1-26.
- Mendoza Gamboa, E., Franco Molina, M., Zapata Benavides, P., Castillo Tello, P., Vera García, M. E., Támez Guerra, R. S., & Rodríguez Padilla, C. 2008. Bovine dialyzable leukocyte extract modulates AP-1 DNA-binding activity and nuclear transcription factor expression in MCF-7 breast cancer cells. *Cytotherapy*, 10(2), 212-219.
- Mokhtari, R. B., Homayouni, T. S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., & Yeger, H. 2017. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, 8(23), 38022-38043.
- Nakajima, H., Golstein, P., & Henkart, P. A. 1995. The target cell nucleus is not required for cell-mediated granzyme- or Fas-based cytotoxicity. *Journal of Experimental Medicine*, 181, 1905-1909.
- OMS. 12 de Septiembre de 2018. *Cáncer*. Disponible en <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- OMS. 2020. *Cáncer*. Recuperado el 26 de Marzo de 2020, de <https://www.who.int/topics/cancer/es/>
- Perou, C., Sorlie, T., Elsen, M., de Rijn, M., Jeffrey, S., Rees, C., . . . Botstein, D. 2000. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*, 406.
- PLM. 2018. *Cryofaxol*. Disponible en [https://www.medicamentosplm.com/Home/productos/cryofaxol\\_solucion\\_inyectable/45/101/43709/162](https://www.medicamentosplm.com/Home/productos/cryofaxol_solucion_inyectable/45/101/43709/162)

- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. 2011. Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nature Reviews Cancer*, *11*, 609-618.
- Pulaski, B. A., & Ostrand-Rosenberg, S. 2000. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols in Immunology*.
- Rodríguez Salazar, M. d., Franco Molina, M., Mendoza Gamboa, E., Martínez Torres, A. C., Zapata Benavides, P., López González, J. M., . . . Rodríguez Padilla, C. 2017. The novel immunomodulator IMMUNEPOTENT CRP combined with chemotherapy agent increased the rate of immunogenic cell death and prevented melanoma growth. *Oncology Letters*, *14*, 844-852.
- Rouzier, R., Perou, C. M., Symmans, W. F., Ibrahim, H., Cristofanili, M., Anderson, K., . . . Pusztai, L. 2005. Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy. *Human Cancer Biology*, *11*(16), 5678-5685.
- Ryter, S. W., Kim, H. P., Hoetzel, A., Park, J. W., Nakahira, K., Wang, X., & Choi, A. K. 2007. Mechanisms of Cell Death in Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, *9*(1), 49-76.
- Samuni, Y., Goldstein, S., Dean, O. M., & Berk, M. 2013. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 4117-4129.
- Santana Krinskaya, S. E., Franco Molina, M., Zárate Treviño, D. G., Prado García, H., Zapata Benavides, P., Torres del Muro, F., & Rodríguez Padilla, C. 2020. IMMUNEPOTENT CRP plus doxorubicin/cyclophosphamide chemotherapy remodel the tumor microenvironment in an air pouch triple-negative breast cancer murine model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *126*.
- Sapunar Goic, F. J. 1994. Citometría de flujo. *Rev. Sanid. Def. Nac.*, *11*(1), 38-42.
- Schiavoni, G., Sistigu, A., Valentini, M., Mattei, F., Sestili, P., Spadaro, F., . . . Bracci, L. 2010. Cyclophosphamide Synergizes with Type I Interferons through Systemic Dendritic Cell Reactivation and Induction of Immunogenic Tumor Apoptosis. *Cancer Research*, *71*(3).
- Schwartz, P. S., & Waxman, D. J. 2001. Cyclophosphamide Induces Caspase 9-Dependent Apoptosis in 9L Tumor Cells. *Molecular Pharmacology*, *60*, 1268-1279.

- Senbanjo, L. T., & Chellaiah, M. A. 2017. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(18).
- Singh, N., Nigam, M., Ranjan, V., Sharma, R., Balapure, A. K., & Rath, S. K. 2009. Caspase Mediated Enhanced Apoptotic Action of Cyclophosphamide- and Resveratrol-Treated MCF-7 Cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 109, 473-485.
- Sistigu, A., Viaud, S., Chaput, N., Bracci, L., Proietti, E., & Zitvogel, L. 2011. Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Seminars in Immunopathology*, 33(4), 369-383.
- Souza Garcia, C. M., Rios de Araújo, M., Paz Lopes, M. T., Diniz Ferreira, M. N., & Dantas Cassali, G. 2014. Morphological and Immunophenotypical Characterization of Murine Mammary Carcinoma 4t1. *Braz J Vet Pathol*, 7(3), 158-165.
- SS. 2009. *Guía de Práctica Clínica. Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Mama en Segundo y Tercer Nivel de Atención*. (C. N. Salud, Ed.) México: CENETEC.
- Strauss, G., Westhoff, M.-A., Posovszky, P. F., Fuida, S., Schanbacher, M., Eckhoff, S. M., . . . Debatin, K. M. 2008. 4-hydroperoxy-cyclophosphamide mediates caspase-independent T-cell apoptosis involving oxidative stress-induced nuclear relocation of mitochondrial apoptogenic factors AIF and EndoG. *Cell Death and Differentiation*, 15, 332-343.
- Subik, K., Lee, J.-F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., . . . Tang, P. 2010. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer. Basic and Clinical Research*, 4, 35-41.
- Suparji, N. S., Chan, G., Sapili, H., Arshad, N. M., In, L. L., Awang, K., & Nagoor, N. H. 2016. Geranylated 4-Phenylcoumarins Exhibit Anticancer Effects against Human Prostate Cancer Cells through Caspase-Independent mechanism. *Plos One*, 11(3).
- Support, B. C. 16 de Febrero de 2019. *Stages of Breast Cancer*. Recuperado el 27 de Marzo de 2020. Disponible en <https://breastcancersupport.org.uk/blog/stages-of-breast-cancer/>

- Sztalmachova, M., Gumulec, J., Raudenska, M., Polanska, H., Holubova, M., Balvan, J., . . . Masarik, M. 2015. Molecular response of 4T1-induced mouse mammary tumours and healthy tissues to zinc treatment. *International Journal of Oncology*, 46(4), 1810-1818.
- Tao, K., Fang, M., Alroy, J., & Sahagian, G. 2008. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer*, 8(228).
- Turton, M. T., Luong, B. T., Tan, Y., & Lauderer, U. 2007. Cyclophosphamide-Induced Apoptosis in COV434 Human Granulosa Cells Involves Oxidative Stress and Glutathione Depletion. *Toxicological Sciences*, 98(1), 216-230.
- VADEMECUM. 01 de Enero de 2015. *Ciclofosfamida*. Disponible en <https://www.vademecum.es/principios-activos-ciclofosfamida-l01aa01>
- Wang, H. F., Wang, Z. Q., Ding, Y., Piao, M. H., Feng, C. S., Chi, G. F., . . . Ge, P. F. 2018. Endoplasmic reticulum stress regulates oxygen-glucose deprivation-induced parthanatos in human SH-SY5Y cells via improvement of intracellular ROS. *CNS Neuroscience Therapy*, 24(1), 29-38.
- Wu, J., & Waxman, D. J. 2019. Immunogenic chemotherapy: Dose and schedule dependence and combination with immunotherapy. *Cancer Lett*, 419, 210-221.
- Yang, X., Liu, Y., Liu, J., Wang, X., & Yan, Q. 2011. Cyclophosphamide-Induced Apoptosis in A431 Cells Is Inhibited by Fucosyltransferase IV. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112, 1376-1383.
- Yoshida, M., Tormitori, H., Machi, Y., Hagihara, M., Higashi, K., Goda, H., . . . Igarashi, K. 2009. Acrolein toxicity: Comparison with reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378, 313-318.
- Zhelev, Z., Ivanova, D., Lazarova, D., Aoki, I., Bakalova, R., & Saga, T. 2016. Docosahexaenoic Acid Sensitizes Leukemia Lymphocytes to Barasertib and Everolimus by ROS-dependent Mechanism Without Affecting the Level of ROS and Viability of Normal Lymphocytes. *Anticancer Research*, 36, 1673-1682.

## **12. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO**

**Ana Luisa Rivera Lazarín**

Candidato para el Grado de  
Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunobiología

**Tesis:** ESTUDIO DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR INDUCIDO POR EL  
IMMUNEPOTENT CRP EN COMBINACIÓN CON CICLOFOSFAMIDA EN  
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

**Campo de estudio:** Biología celular

**Datos personales:** Nacida en Saltillo, Coahuila el 28 de Enero de 1994. Hija de Carlos  
Rivera Rodríguez y Ma. Patricia Lazarín Cierra.

**Educación:** Egresada de la Universidad Autónoma de Coahuila, grado obtenido de Lic.  
Químico Farmacobiólogo con especialidad en Análisis Clínicos, 2018. Tesis  
titulada “Evaluación del efecto del dicloroacetato de sodio como tratamiento  
coadyuvante en líneas celulares de cáncer”. Estancia de investigación en la  
Universidad de Guanajuato en el proyecto “Evaluación de nanocristales de metales  
pesados por la exposición con especies de cándida”, 2016.

**Reconocimientos:**

- Acreditación del Examen General de Egresados de Licenciatura (EGEL), 2018.
- Reconocimiento al Mérito Académico por el Primer Lugar en la generación, 2018.

- Reconocimiento por participar en la Sociedad de Alumnos de la Facultad de Ciencias Químicas como responsable de la tesorería, 2016-2017.
- Premio a la mejor propuesta de la Unidad Saltillo en la categoría de “Compromiso Institucional” por ser miembro del Comité de Certificación como Espacio 100% Libre de Humo de Tabaco en la Facultad de Ciencias Químicas, 2015.

### **Experiencia profesional:**

- Practicante de Laboratorio de Análisis Clínicos: Clínica Quirúrgica La Concepción (Junio 2017- Agosto 2017). Actividades: toma de muestras, procesar muestras en el área de hematología, serología y parasitología, química sanguínea, análisis clínicos especiales y microbiología.

### **Publicaciones:**

#### Artículos científicos en Revistas JCR

- Zugasti-Cruz A, Rivera-Lazarín AL, Silva Belmares SY, Alfaro-A. M, Sierra-Rivera CA. Effect of sodium dichloroacetate as single agent or in combination with cisplatin in normal and human cervical cancer cell lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2020; 19 (3): 467-474
- Rivera-Lazarín AL, Zugasti-Cruz A, Aldape-de la Peña G, Silva-Belmares SY, Sierra-Rivera CA. Synergistic cytotoxic effect of sodium dichloroacetate combined with chemotherapeutic drugs on B16F10 murine melanoma cell line. *Biomedical Research* 2019; 30(1): 179-185

#### Artículos científicos en Revistas arbitrarias

- Rivera-Lazarín AL, Martínez-Torres CA, Rodríguez-Padilla C. El IMMUNEPOTENT CRP induce citotoxicidad, pérdida de potencial de membrana



mitocondrial, formación de especies reactivas de oxígeno y detención del ciclo celular en células 4T1. XXX Congreso Nacional de Investigación en Medicina. Monterrey, México, Octubre 2019.

- Rivera-Lazarín AL, Sierra-Rivera CA, Rodríguez-Salazar MC, González-Zavala MA, Silva-Belmares SY, Zugasti-Cruz A. Efecto citotóxico del dicloroacetato de sodio y cisplatino sobre cáncer de pulmón y melanoma in vitro. XXIX Congreso Nacional de Investigación en Medicina. Monterrey, México, Octubre 2017.

**Presentaciones en modalidad póster:**

- El IMMUNEPOTENT CRP induce citotoxicidad, pérdida de potencial de membrana mitocondrial, formación de especies reactivas de oxígeno y detención del ciclo celular en células 4T1. XXX Congreso Nacional de Investigación en Medicina. Monterrey, México, Octubre 2019.
- Cyclophosphamide and Epirubicin promotes ROS production and cytotoxicity in microglial cells. VII Congreso de Especies Reactivas de Oxígeno en Biología y Medicina. México, D.F., Agosto 2019.
- Cyclophosphamide, Epirubicin and IMMUNEPOTENT CRP-induce reactive oxygen species production in breast cancer cells. VII Congreso de Especies Reactivas de Oxígeno en Biología y Medicina. México, D.F., Agosto 2019.
- El IMMUNEPOTENT CRP en combinación con ciclofosfamida tiene un efecto citotóxico sinérgico en células de cáncer de mama. VI Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y IV Simposio Nacional de Microbiología Aplicada. Monterrey, México, Abril 2019.

- Potencial antitumoral del dicloroacetato de sodio sobre líneas celulares de melanoma y cáncer de pulmón. X Encuentro de Expresión Científica Estudiantil. Saltillo, México, Noviembre 2017.
- Efecto citotóxico del dicloroacetato de sodio y cisplatino sobre cáncer de pulmón y melanoma in vitro. XXIX Congreso Nacional de Investigación en Medicina. Monterrey, México, Octubre 2017.
- Efecto citotóxico del dicloroacetato de sodio y ácido ascórbico sobre la línea de melanoma murino B16F10. IX Encuentro de Expresión Científica Estudiantil. Arteaga, México, Octubre 2016.

#### **Cursos adicionales:**

- Diagnóstico de parasitosis. Saltillo, México, Mayo 2017.
- Hematología Clínica. I Semana de la Ciencia, la Cultura y el Deporte. Saltillo, México, Marzo 2017.
- Sistema Integral de Capacitación en Dispensación. Saltillo, México, Marzo 2017.
- Garantía de la Calidad en el Laboratorio Clínico. UAdeC. Saltillo, México, Octubre 2016.
- La química en pro de la energía limpia y el bienestar mundial. XI Congreso Internacional de Ciencias Químicas, Ambiental y Biotecnología. Mazatlán, México, Abril 2016.
- Manejo de emergencias, remanentes y residuos químicos. I Semana de la Ciencia. UAdeC. Saltillo, México, Mayo 2014.

“El cáncer es ubicuo en la población humana; la única manera cierta de evitarlo consiste en no nacer, ya que vivir supone un riesgo.”

Robbins y Cotran. 2015. *Patología estructural y funcional*. Barcelona; Editorial Elsevier.